

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Funktion der Kanalproteine TRPC1 und TRPC6 in embryonalen Fibroblasten und Podozyten der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Meike Fahlbusch

aus

Konstanz

2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2012

Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen vorgestellt bzw. veröffentlicht.

1. Vortrag beim 5. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe “Biochemische Pharmakologie und Toxikologie” Young Scientists meet Experience der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e. V. in Gönzburg, Mai 2010: Phospholipase C-epsilon (PLC ϵ)-mediated activation of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) increases barrier function of glomerular podocytes. Meike Fahlbusch, Hermann Kalwa, Ursula Storch, Alan Smrcka, Friedhelm Hildebrandt, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich.
2. Vorstellung eines Posters bei der 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Frankfurt, März/April 2011: Phospholipase C ϵ (PLC ϵ)-dependent activation of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels in kidney podocytes, murine embryonic fibroblasts (MEFs) and human embryonic kidney cells (HEK 293): A general mechanism? Tim Mayer, Meike Fahlbusch, Hermann Kalwa, Ursula Storch, Holger Barth, Stefan Offermanns, Allan Smrcka, Friedhelm Hildebrandt, Thomas Gudermann and Alexander Dietrich. Abstract veröffentlicht in Naunyn-Schmiedberg’s Archives of Pharmacology 383, Supplement: P109 (2011) .
3. Vorstellung eines Posters bei der 1st Conference on Impedance-Based Cellular Assays in Regensburg, August 2011: Phospholipase C ϵ (PLC ϵ)-mediated activation of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) increases barrier function of glomerular podocytes. Meike Fahlbusch, Hermann Kalwa, Allan Smrcka, Friedhelm Hildebrandt, Thomas Gudermann and Alexander Dietrich.
4. Phospholipase C epsilon induced TRPC6 activation regulates actin fibre formation in primary podocytes. Hermann Kalwa, Meike Fahlbusch, Tim Mayer, Ursula Storch, Stefan Offermanns, Holger Barth, Alan Smrcka, Friedhelm Hildebrandt, Thomas Gudermann & Alexander Dietrich. Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Funktion von Calcium in der Zelle	5
3.2	Funktion der Phospholipasen C	6
3.3	Entdeckung der TRPs	8
3.4	Die TRP-Familie	9
3.5	Die TRPC-Unterfamilie	13
3.6	Nieren- und Podozytenfunktion	18
3.7	Zielsetzung der Arbeit	22
4	Material und Methoden	24
4.1	Material	24
4.1.1	Chemikalien	24
4.1.2	Enzyme, Kits, Marker	26
4.1.3	Geräte	27
4.1.4	Verbrauchsmaterial	28
4.1.5	Standardlösungen und Puffer	28
4.1.5.1	PBS (Phosphate Buffered Saline)	28
4.1.5.2	PBST	28
4.1.5.3	4-fach Tris/SDS Puffer pH 6,8	28
4.1.5.4	4-fach Tris/SDS Puffer pH 8,8	29
4.1.5.5	2-fach Laemmli (Ladepuffer für Proteinelektrophorese) . .	29
4.1.5.6	10-fach Laufpuffer (für die SDS-Page Gelelektrophorese) .	29
4.1.5.7	10-fach Transferpuffer (für den Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran)	30
4.1.5.8	Lysepuffer	30
4.1.5.9	SOB-Medium	30

Inhaltsverzeichnis

4.1.5.10	SOC-Medium	31
4.1.5.11	Stopplösung	31
4.1.5.12	Fixierer	31
4.1.5.13	Transformationspuffer (für die Herstellung kompetenter Bakterien)	31
4.1.5.14	DAPI-Gebrauchslösung	31
4.1.5.15	2-fach HEPES-Ringer Lösung	32
4.1.5.16	LB-Medium	32
4.1.5.17	50-fach Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	32
4.1.5.18	Puffer B (Verdau von Mausgewebe)	32
4.1.5.19	Isolierlösung	33
4.1.5.20	HBSS-Puffer (HBSS = Hank's balanced salt solution) . .	33
4.1.5.21	DEPC-Wasser	33
4.1.6	Antikörper	34
4.1.6.1	Erstantikörper	34
4.1.6.2	Zweitantikörper	35
4.1.6.3	Toxine	35
4.1.7	Plasmide	35
4.1.8	Oligonukleotide	36
4.1.8.1	Genotypisierung von Mäusen	36
4.1.8.2	Oligonukleotide für quantitative Reverse Transcriptase(RT)- PCR	37
4.1.8.3	Oligonukleotide für die Mutagenese	37
4.1.8.4	Oligonukleotide für die Klonierung	38
4.1.9	Sonstige Hilfsmittel	39
4.2	Mäuse	39
4.2.1	Tierhaltung	39
4.2.2	Mauslinien	40
4.2.3	Genotypisierung der Mäuse	40
4.2.4	Präparation von Organen	41
4.3	Zellkultur	42
4.3.1	Isolation	42
4.3.1.1	Isolation von embryonalen Fibroblasten	42
4.3.1.2	Isolation von Podozyten	42
4.3.2	Kultivierung der Zellen	43
4.3.3	Zelllinien und Nährmedien	43

Inhaltsverzeichnis

4.3.4	Transfektionen	44
4.3.5	Kryokonservierung von kultivierten Zellen	45
4.4	Proteinchemische Methoden	46
4.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	46
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
4.4.3	Oberflächenbiotinylierung	47
4.4.4	Koimmunpräzipitation	49
4.4.5	SDS-Page (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	50
4.4.6	Elektrotransfer von Proteinen auf eine Membran	51
4.4.7	"Western Blot"	52
4.5	Molekularbiologische Methoden	53
4.5.1	RNA Isolierung aus Zellen	53
4.5.2	Erststrangsynthese	53
4.5.3	Quantitative RT(Reverse-Transcriptase)-PCR	54
4.5.4	Ligation	55
4.5.5	Mutagenese	56
4.5.6	Herstellung von Agarplatten	57
4.5.7	Herstellung kompetenter Bakterien	57
4.5.8	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien	58
4.5.9	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	58
4.5.10	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	59
4.5.11	Sequenzierung	59
4.5.12	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	59
4.5.13	DNA-Auftrennung mittels Elektrophorese	60
4.6	Spezielle Messmethoden und Versuche	60
4.6.1	Mikroskopische Analyse der Zellmigration	60
4.6.2	Wundheilung-Test mit Hilfe des "electrical cell impedance sensor" Systems	61
4.6.3	Messung der intrazellulären Ca^{2+} - Ionen Konzentration mittels Calcium Imaging	61
4.6.3.1	Vorbereitungen	62
4.6.3.2	Beladen der Zellen	63
4.6.3.3	Messen der Zellen	64
4.6.4	Immunhistologische Zellfärbung der Podozyten	64
4.6.5	Phalloidin-Färbung	65

Inhaltsverzeichnis

4.6.6	Apoptose-Untersuchungen	66
4.6.6.1	Quantifizierung von Apoptoseraten mit Hilfe des TUNEL-Assays	66
4.6.6.2	Apoptose-Untersuchung durch Annexin-Färbung	67
4.6.6.3	Bestimmung der Apoptoseeigenschaften von Zellen mit CaspaseGlow	68
4.6.7	Messung der Zellviabilität mit dem WST (water soluble tetrazolium)-Assay	68
4.6.8	Inhibition der Rho-Proteine mit spezifischen Toxinen	69
4.6.9	Inhibition der $G_{\alpha 12/13}$ -Proteine mit Hilfe von spezifischen shRNAs	69
4.6.10	Klonierung des mTRPC1	69
4.6.11	Fusion der mTRPC1 mRNA mit der codierenden Region eines Hämagglutinin-Epitops	71
4.7	Statistik	73
5	Ergebnisse	74
5.1	Analyse der TRPC1-Prozessierung und -Funktion	74
5.1.1	Heterologe Expression eines murinen TRPC1-Kanals	74
5.1.1.1	Klonierung einer murinen TRPC1 cDNA	74
5.1.1.2	Heterologe Expression des murinen TRPC1-Kanals und Nachweis der Expression im Western Blot	76
5.1.1.3	Untersuchungen zur enzymatischen Prozessierung des mTRPC1-Proteins durch Applikation von Proteaseinhibitoren	77
5.1.1.4	Proteolyse des TRPC1-Kanals durch Trypsin	79
5.1.2	TRPC1 in primären embryonalen Fibroblasten der Maus	80
5.1.2.1	Vergleichende Analyse von embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) aus TRPC1-defizienten- und Wildtyp-Mäusen	80
5.1.2.2	Analyse der Migration und Proliferation der embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) in einem Test auf Wundheilung	80
5.2	TRPC6 -PLC ϵ -Interaktion in Podozyten der Niere	82
5.2.1	Immunhistologische Untersuchungen von Podozyten	82
5.2.2	Analyse der mRNA-Expressionsprofile in Podozyten mittels quantitativer "real time PCR"	82
5.2.3	Quantifizierung der Transfektionseffizienz eines Markerplasmids in primären Podozyten	83
5.2.4	Quantifizierung der Zellviabilität der Podozyten	85

Inhaltsverzeichnis

5.2.5	Quantifizierung von nekrotischen und apoptotischen Podozyten . . .	86
5.2.6	Regulation der Calcium-Homöostase in Podozyten nach Rezeptor- stimulation	90
5.2.7	Nachweis einer direkten Interaktion zwischen PLC ϵ und TRPC6 durch Koimmunpräzipitation in HEK293-Zellen und in Podozyten	92
5.2.8	Vergleich der PLC ϵ -WT mit einer PLC ϵ -Patientenmutation in HEK293- Zellen	93
5.2.9	Untersuchungen zur Aufklärung der Signaltransduktionskaskade von der Bindung von Angiotensin II an den AT ₁ -Rezeptor zur Aktivie- rung des TRPC6-Kanals	94
5.2.10	Analyse der kontraktilen Funktionen durch Untersuchungen am Aktinzytoskelett des Podozyten	96
6	Diskussion	103
6.1	Analyse der TRPC1-Prozessierung und -Funktion	103
6.1.1	Analyse der TRPC1-Expression und -Prozessierung	103
6.1.2	Analyse der TRPC1-Funktion im murinen embryonalen Fibrobla- sten (MEFs)	105
6.2	TRPC6-PLC ϵ -Interaktion in Podozyten der Niere	106
6.2.1	Untersuchungen zur TRPC6- und PLC ϵ -Funktion in primär iso- lierten Podozyten und HEK293-Zellen	106
6.3	Ausblick	114
7	Anhang	115
7.1	Abkürzungsverzeichnis	115
7.2	Danksagung	119
	Literaturverzeichnis	120

Abbildungsverzeichnis

3.1	G _q -Signalweg: AT ₁ : Angiotensin-Rezeptor 1; mACh: Acetylcholinrezeptor vom Muskarintyp; PLC: Phospholipase C; PIP ₂ : Phosphatidylinositolbisphosphat; DAG: Diacylglycerol; IP ₃ : Inositol-1,4,5-trisphosphat.	6
3.2	Schematischer Aufbau der Phospholipasen. Funktionelle Domänen: EF: EF-Hand-Motive, X, Y: katalytisch aktive Domänen, C2: konservierte C2-Domäne, PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne, SH: SH-Domänen für die Bindung von Tyrosinkinasen, RasGEF: RasGEF-Domäne, RA: Ras-Bindungsmotiv.	7
3.3	Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP ₂) in die Second-Messenger Moleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP ₃) durch Phospholipasen C (PLC).	7
3.4	Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie in Säugern. Die Länge der Äste stellt dabei die evolutionäre Entfernung von benachbarten Proteinen dar. Die einzelnen TRP-Familien sind farblich gekennzeichnet. .	11
3.5	Schematischer Aufbau der TRPs an jeweils einem Mitglied der Unterfamilien.	12
3.6	Phylogenetischer Stammbaum der TRPC-Familie in Säugern. Die Länge der Äste stellt dabei die evolutionäre Entfernung von benachbarten Proteinen dar.	13
3.7	Bildung von TRPC-Kanal Homo- und Heterotetrameren aus gleichen oder verschiedenen Kanalmonomeren.	14
3.8	Elektrophysiologische Messungen (Strom-Spannungskurven) von TRPC-Kanälen im Überexpressionsmodell in HEK293-M1-Zellen (HEK293-Zellen, welche stabil den muskarinergen M1-Rezeptor exprimieren). Con: Kontrolle vor Carbachol-Zugabe, carb: Ströme nach Zugabe von 20 µM Carbachol.	15
3.9	Elektrophysiologische Messungen (Strom-Spannungskurven) von TRPC-Kanälen im Überexpressionsmodell in HEK293-M1-Zellen (HEK293-Zellen, welche stabil den muskarinergen M1-Rezeptor exprimieren). Con: Kontrolle vor Carbachol-Zugabe, carb: Ströme nach Zugabe von 20 µM Carbachol.	15
3.10	Querschnitt durch eine Kapillarschlinge in der Bowman'schen Kapsel. . .	19

Abbildungsverzeichnis

3.11	Lokalisationen der bekannten Patientenmutationen im TRPC6-Kanalprotein. A: ankyrin repeat; L: lipid/trafficking domain; CC: coiled-coil domain; EWKFAR: konservierte TRP-Box. Die Buchstaben stehen für Aminosäuren, die Zahlen geben die Position an, an der die vordere gegen die hintere Aminosäure ausgetauscht ist, X steht für ein Stopp-Codon, was ein trun- kiertes Protein bedingt.	20
3.12	Lokalisationen der bekannten Patientenmutationen der PLC ϵ . RasGEF: guanine nucleotide exchange factor für Ras-ähnliche kleine GTPasen; PH: pleckstrin homology; PLC_X: Phospholipase C katalytische Domäne X- Teil; PLC_Y: Phospholipase C katalytische Domäne Y-Teil; C2: Prote- inkinase C konservierte Region, Untergruppe 2; RA1: RasGTP Bindedo- mäne 1; RA2: RasGTP Bindedomäne 2. Die Buchstaben stehen für Ami- nosäuren, die Zahlen geben die Position an, an der die vordere gegen die hintere Aminosäure ausgetauscht ist, X steht für ein Stopp-Codon, was ein trunkiertes Protein bedingt.	21
4.1	Reaktion der Oberflächenbiotinylierung.	47
4.2	Methode der Oberflächenbiotinylierung.	48
4.3	Isosbestischer Punkt der Fluoreszenz von Fura-2.	62
4.4	Spaltung von Fura-2-AM zu Fura-2	63
5.1	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der mTRPC1-cDNA. Siehe Text für weitere Details.	74
5.2	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der mTRPC1-cDNA zur aminoterminalen oder carboxyterminalen Expression eines Hämagglutinin- Epitops	75
5.3	Heterologe Expression der murinen TRPC1-cDNA in HEK293-Zellen. Im Western Blot wurden Proteinlysate aus nicht transfizierten (untransfiziert) und mit cDNAs transfizierten Zellen (mTRPC1, HA-mTRPC1, mTRPC1- HA, HA-mTRPC1-HA, TRPC6-HA) aufgetragen. Der linke Teil des Blots wurde mit einem spezifischen TRPC1-Antikörper der Maus aus der Ar- beitsgruppe Tsiokas und der rechte Teil des Blots mit einem Hämaggluti- nin (HA)-spezifischen Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle wurde auch der TRPC6-Kanal mit Hämagglutinin-Epitop exprimiert.	76

Abbildungsverzeichnis

5.4	Western Blot mit Lysaten (5 µg/Bahn) mTRPC1-transfizierter HEK293-Zellen, die unter verschiedenen Pufferbedingungen abgeerntet wurden. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit einen TRPC1-spezifischen Antikörper der Arbeitsgruppe Tsiokas.	78
5.5	Western Blot mit Lysaten (5 µg/Bahn) mTRPC1-transfizierter HEK293-Zellen, die unter verschiedenen Pufferbedingungen abgeerntet wurden. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit einen Hämagglutinin-spezifischen Antikörper.	78
5.6	Trypsin-Verdau eines Zelllysats von HEK293-Zellen, die zuvor mit HA-mTRPC1-HA transfiziert worden waren. Links Nachweis mit einem TRPC1-spezifischen Antikörper der Maus der Arbeitsgruppe Tsiokas, rechts mit einem HA-spezifischen Antikörper. Die Verdauzeit durch Trypsin betrug 15 min bei 37°C.	79
5.7	Analyse der Zellviabilität der MEFs. Zellen von WT-Tieren wurden mit Zellen von TRPC1-defizienten Tieren verglichen. Die Anzahl der Klone ist unter den Balken in Klammern dargestellt. WT = Wildtyp-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem "student's t-test" ** = $p < 0,01$	80
5.8	Wundheilungsassay der MEFs im ECIS-System. Die Geraden wurden mathematisch an die jeweiligen Wachstumskurven angepasst, um die Steigung (TRPC1-/-: 4,02; WT: 14,20) zu errechnen. In Klammern ist die Zahl der durchgeführten Experimente mit einem Klon der MEFs des jeweiligen Genotyps angegeben.	81
5.9	Anfärbung von Wildtyp-Podozyten mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Podocin-Antikörper. Zellkerne wurden durch Inkubation mit DAPI gefärbt.	82
5.10	TRPC-Expression in Podozyten. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Klone für die Dreifachbestimmung an. Die TRPC5-Expression wurde nur in WT und TRPC6-defizienten Zellen und auch nur in 6 bzw. 7 Klonen analysiert. WT = Wildtyp Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ nach Anwendung einer ANOVA.	83
5.11	WST-Assay mit Podozyten der verschiedenen Genotypen. Hier sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen aufgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Messungen pro Genotyp sind in Klammern unter dem Diagramm aufgeführt. WT = Wildtypzellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ nach Anwendung einer ANOVA.	85
5.12	Verteilung der Datenpunkte und statistische Auswertung des WST-Assays mit einer ANOVA. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$	86

Abbildungsverzeichnis

5.13	Analyse der Apoptoserate von WT-Podozyten mit dem Annexin V-Assay. Grün-fluoreszierende Zellen sind apoptotisch, aber nur wenn sie keinen rot-gefärbten Zellkern besitzen, da dies auf eine Zellnekrose hindeutet. . . .	87
5.14	Analyse der Apoptoserate von WT-Podozyten im Vergleich zu TRPC6-defizienten Podozyten mit Hilfe eines Caspase-Assay. Die Anzahl der Messungen ist in der Grafik in Klammern dargestellt. WT = Wildtyp Zellen. ** = $p < 0,01$ nach Anwendung eines "student's t-tests".	88
5.15	Apoptose in Podozyten gemessen mit dem sog. "TUNEL-Assay". Die Podozyten waren für die Positivkontrolle zuvor mit DNase behandelt worden. Links ist die Kernfärbung mit Hoechst 33342, rechts sind die apoptotischen Zellen zu sehen.	88
5.16	Quantifizierung der Apoptoserate mit Hilfe des sog "TUNEL-Assays". Es sind die absoluten apoptotischen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl angegeben.	89
5.17	Gemessene Apotoseraten eines WT-Podozytenklons (in %) mit Hilfe des TUNEL-Assay. Es sind die apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben.	90
5.18	Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in primären Podozyten aus Wildtyp (WT)-, TRPC6-/- und PLC ϵ -/- Mäusen nach Applikation von 100 μM Angiotensin II (AngII). Die Fluoreszenzemission des Ca^{2+} -Indikators Fura2 wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm gemessen. Der Quotient (ratio 340/380) ist proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.	91
5.19	Koimmunpräzipitation von TRPC6 und PLC ϵ in primären Podozyten. Oben: Nachweis des Proteins im Lysat mit einem PLC ϵ -spezifischen Antikörper. Unten: Western Blot mit Immunpräzipitaten, die aus Zelllysaten mit dem PLC ϵ -spezifischen Antikörper gewonnen wurden. Zur Kontrolle ist eine Immunpräzipitation mit Immunglobulin G (IgG) gezeigt.	92

Abbildungsverzeichnis

5.20	PLC ϵ lässt sich mit TRPC6 koimmunpräzipitieren. Oben: 5 % der eingesetzten Zelllysate von TRPC6-HA exprimierenden HEK293-Zellen, die mit unterschiedlichen cDNAs transfiziert wurden. Die Position des TRPC6-Kanalproteins, fusioniert mit dem Hämagglutinin-Epitop, ist durch Pfeile markiert. Unten: Western Blot mit Immunpräzipitaten, die aus Zelllysaten mit den angegebenen Antikörpern (KoIP. mit) gewonnen wurden. Das TRPC6-Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (TRPC6 AK) detektiert. HA AK = Hämagglutinin Antikörper, IgG = Immunglobulin G, GFP AK = Antikörper gegen das grün-fluoreszierende Protein	93
5.21	Manganionen-Einstrom in HEK293-Zellen nach Zugabe von 1 mM MnCl ₂ und 100 μ M Carbachol (CCh). Untersucht wurden Zellen, die die PLC ϵ (PLC ϵ WT) oder eine mutierte Form der PLC ϵ (PLC ϵ H1144L) exprimierten. MnCl ₂ : Mangandichlorid.	94
5.22	Änderung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration in primären Podozyten, präinkubiert mit Rho-Toxinen (CIN-C3 + C2IIa) oder Kontrollpuffer nach Applikation von 100 μ M AngII. Die Fluoreszenzemission des Ca ²⁺ -Indikators Fura2 wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm gemessen. Der Quotient (ratio 340/380) ist proportional zur intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.	95
5.23	Messung des intrazellulären Mn ²⁺ -Einstroms in HEK293-Zellen, die den TRPC6-Kanal stabil exprimieren, nach Expression einer shRNA gegen G $\alpha_{12/13}$ oder einer Kontroll shRNA. Die Rezeptoraktivierung erfolgte mit 100 μ M Carbachol (CCh) nach der Zugabe von 1 mM MnCl ₂ . Die Inhibition der Fluoreszenzemission des Ca ²⁺ -Indikators Fura2 durch Mn ²⁺ -Ionen, wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 360 nm gemessen. Da TRPC6-Kanäle Kationen wie Mn ²⁺ unspezifisch permeieren lassen, sind die gemessenen Werte proportional zur TRPC6-Aktivität in den Zellen.	96
5.24	Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von WT-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.	97
5.25	Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.	98

Abbildungsverzeichnis

5.26	Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von PLC ϵ -defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.	98
5.27	Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von PLC ϵ -und TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.	99
5.28	Analyse der F-Aktinpolymerisation in Podozyten unterschiedlicher Genotypen vor und nach Inkubation mit Angiotensin II (AngII) (100 μ M). Aufgetragen sind die Mittelwerte der relativen Graustufen. Es wurden jeweils 53 Zellen vermessen. * = $p < 0,05$ nach Anwendung einer ANOVA.	100
5.29	Änderung in der Aktinpolymerisation in konfluenten primären Podozyten von WT-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden.	101
5.30	Änderung in der Aktinpolymerisation in konfluenten primären Podozyten von TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 μ M Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden.	101

- 6.1 Zusammenfassung der Befunde dieser Doktorarbeit im Gesamtkonzept der wissenschaftlichen Literatur zu dem Thema. Proteine der Podozyten, die durch Aktivierung die Barrierefunktion der Podozyten erhöhen und damit die Schlitzmembran stabilisieren, sind blau hervorgehoben. Proteine, die diese Vorgänge hemmen und Symptome der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) bei den Patienten auslösen können, sind rot oder grün (TRPC-Kanäle) markiert. Eine Aktivierung des Angiotensin 1-Rezeptors (AT_1 -Rezeptor) durch Angiotensin II (AngII) z. B. bei Bluthochdruck führt über die G-Protein $\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten zur Aktivierung des Rho Guaninnukleotidaustauschfaktors (RhoGEF) zu aktivierten GTP-beladenen Rho-Proteinen, die für die Bildung von Aktin-Stressfasern verantwortlich sind. Rho-Proteine können auch die PLC ϵ aktivieren, die durch Bildung von Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP $_2$) einen Calciumioneneinstrom durch den TRPC6-Kanal auslösen kann. Die erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration führt zur Aktivierung von Calcineurin, das Synaptopodin dephosphoryliert und für einen proteolytischen Abbau zugänglich macht. Phosphoryliertes Synaptopodin hingegen ist in der Lage, den Abbau von Rho-Proteinen zu unterbinden. Vermehrter Calciumioneneinstrom durch überaktiviert („gain of function“) mutierte TRPC6-Kanäle kann also durch vermehrten Rho-Abbau die Aktin-Stressfaser-Bildung inhibieren. Zusätzlich kann der Calciumioneneinstrom über mutierte TRPC6- und vermehrt exprimierte TRPC1/4-Kanäle in PLC ϵ -defizienten Podozyten eine Apoptose oder Nekrose der Podozyten auslösen und durch eine verminderte Stabilität der Schlitzmembran eine Albuminurie in FSGS-Patienten induzieren. 113

Tabellenverzeichnis

3.1	Anzahl der TRP-Gene in verschiedenen Spezies.	12
3.2	Mutationen im TRPC6-Kanalprotein.	21
3.3	Mutationen in der PLC ϵ	22
4.1	Standardchemikalien.	24
4.2	Spezielle Chemikalien.	25
4.3	Enzyme, Kits, Marker.	26
4.4	Geräte.	27
4.5	Verbrauchsmaterial.	28
4.6	Verwendete Erstantikörper.	34
4.7	Verwendete Zweitantikörper.	35
4.8	Verwendete Toxine.	35
4.9	Verwendete Plasmide.	36
4.10	Oligonukleotide zur Genotypisierung.	36
4.11	Oligonukleotide für die RT-PCR.	37
4.12	Oligonukleotide für die Mutagenese.	38
4.13	Oligonukleotide für die Klonierung, in blau ist das Hämagglutinin-Tag dargestellt.	39
4.14	Zelllinien und Nährmedien	43
5.1	Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden. Das Amaxa-Gerät arbei- tet mit einer Küvette, in der ein elektrisches Feld erzeugt wird. Im Neon- System hingegen wird die Elektroporation in einer Pipette durchgeführt. G5A-Viren sind rekombinante Lentiviren, die das grün-fluoreszierende Pro- tein (GFP) exprimieren.	84
5.2	Relative Graustufen von unbehandelten Podozyten im Vergleich zu Wild- typ Podozyten. Die Unterschiede sind nur bei TRPC6-defizienten Zellen signifikant.	100

1 Zusammenfassung

TRPC („classical transient receptor potential“)-Kanäle 1-7 wurden bisher als unselektive Kationenkanäle in heterologen Expressionssystemen beschrieben. Ihre physiologische und pathophysiologische Rolle in verschiedenen Organen und Geweben des menschlichen Körpers ist aber noch weitgehend unklar. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion zweier Mitglieder der TRPC-Familie, TRPC1 und TRPC6, in verschiedenen Zellsystemen mit Hilfe von Untersuchungen an den entsprechenden gendefizienten Mausmodellen näher zu analysieren.

Nach der Klonierung der codierenden Sequenz des murinen TRPC1-Proteins aus Mausgeweben, wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus TRPC1-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert. Ein Vergleich zeigte, dass das Fehlen des TRPC1-Kanals die Viabilität dieser Zellen signifikant steigerte und die Wundheilungsrate signifikant herabsetzte.

Durch die Identifikation sogenannter überaktivierter („gain-of-function“) TRPC6-Kanal-Mutanten in Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) [1, 2] war dann insbesondere die Funktion dieses Kanals in den Podozyten der Niere von besonderem Interesse. Wenig später wurden auch funktionslose („loss-of-function“) Mutanten der Phospholipase C- ϵ (PLC ϵ) in Patienten mit dem gleichen oder einem ähnlichen Krankheitsbild beschrieben [3], das zu einer Erhöhung des Serumproteingehalts im Urin (Proteinurie) führt. Zur Beantwortung der Frage, ob beide Proteine interagieren und Komponenten eines gemeinsamen Signalweges sind, wurden primäre Podozyten aus Mäusen isoliert. In der Tat wurde in primären Podozyten und in HEK („Human Embryonic Kidney“) 293-Zellen eine Interaktion beider Proteine identifiziert und ein möglicher Signalweg von der Aktivierung des Angiotensin 1 (AT₁)-Rezeptors zum PLC ϵ -induzierten Calciumioneneinstrom durch TRPC6-Kanäle aufgezeigt. Darüber hinaus wurden TRPC6-, PLC ϵ - und TRPC6/PLC ϵ -defiziente Podozyten mit Wildtyp-Podozyten in funktionellen Testsystemen verglichen. Zunächst konnte eine vermehrte Expression von TRPC4- und TRPC5-Kanälen in PLC ϵ -defizienten und TRPC6/PLC ϵ -defizienten Podozyten identifiziert werden. Außerdem zeigte sich in ersten Untersuchungen, dass das Fehlen des TRPC6-Kanals zu einer erhöhten Zellviabilität und zu einer verminderten Apoptoserate der Podozyten

1 Zusammenfassung

führte. In sog. „Calcium-Imaging“-Experimenten wurde ein stark reduzierter Calciumioneneinstrom in TRPC6- und PLC ϵ -defizienten Podozyten nach AT₁-Rezeptoraktivierung durch Angiotensin II beobachtet. Da Podozyten durch ihre Barrierefunktion wesentlich zur Stabilität des glomerulären Filters beitragen, wurde auch die Veränderung des Zytoskeletts durch Aktinpolymerisation näher untersucht. Es zeigte sich, dass Podozyten nach Applikation von Angiotensin II durch eine stärkere Polymerisation von globulärem Aktin vermehrt sog. „Aktin-Stressfibern“ ausbilden und abflachen. TRPC6-defiziente Podozyten hingegen zeigen bereits im Ruhezustand deutlich mehr Aktin-Stressfibern, die nach Gabe von Angiotensin II nicht mehr signifikant in ihrer Anzahl zunehmen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind im Einklang mit der Hypothese, dass ein zu starker Calciumioneneinstrom in Podozyten durch überaktivierende TRPC6-Mutationen zu einer geringeren Podozytenstabilität und zu einer erhöhten Apoptoserate führen kann. Die mangelnde Stabilität des glomerulären Filters in den FSGS-Patienten führt dann zu einer Proteinurie und schließlich zum Nierenversagen. Durch Expression der TRPC6-Mutationen in TRPC6-defizienten Podozyten könnte sich in Zukunft die Rolle des Kanals als wichtige pharmakologische Zielsubstanz für eine Pharmakotherapie der FSGS bestätigen.

2 Summary

TRPC („classical transient receptor potential“) channels 1-7 have been initially characterized as unselective cation channels in heterologous expression systems. Their physiological and pathophysiological function in different organs and tissues of the human body however, remains elusive. Analyzing the role of two members of the TRPC family, TRPC1 and TRPC6, in different cell systems from gene-deficient mouse models was the major goal of this thesis.

After cloning the coding sequence of the murine TRPC1-channel from mouse tissues, murine embryonic fibroblasts (MEFs) from TRPC1-deficient and wild-type mice were isolated. A comparative analysis revealed that TRPC1-deficiency results in a significantly increase in viability and decrease in wound-healing ability of these cells in comparison to wild-type cells.

TRPC6-function in podocytes of the kidney became a special interest by identifying gain-of-function mutations of TRPC6 in patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) [1, 2]. Moreover, loss-of-function mutations of phospholipase C- ϵ (PLC ϵ) were recently identified in patients with FSGS or a similar disease pattern [3] which results in an increase of serum proteins in the urine (proteinuria). Primary murine podocytes were isolated to investigate, if both proteins interact and are components of the same signal transduction pathway. A physical interaction of both proteins was demonstrated in podocytes and in a HEK („Human Embryonic Kidney“)293-cell line as well as a signal transduction pathway from AT₁(angiotensin 1)-receptor activation by angiotensin II to PLC ϵ induced Ca²⁺-influx through TRPC6 channels was identified. Moreover, analysis of TRPC6-, PLC ϵ - and TRPC6/PLC ϵ -deficient primary podocytes revealed an up-regulation of TRPC4 and TRPC5 in the two latter cell lines in comparison to wild-type cells. TRPC6-deficiency resulted in higher cell viability and decreased apoptosis of podocytes. Calcium imaging experiments demonstrated a decreased calcium influx in TRPC6- and PLC ϵ -deficient podocytes after AT₁-receptor activation by application of angiotensin II. Barrier function of podocytes is critically regulated by actin polymerization and changes in the cytoskeleton. Application of angiotensin II resulted in an increased actin polymerization and a significantly higher number of actin stress fibers

2 Summary

as well as in flattened cell morphology. Most interestingly, TRPC6 deficient podocytes already exposed a large number of actin stress fibers before application of angiotensin II which was not significantly increased after incubation with angiotensin II.

These data confirm the hypothesis of a decreased barrier function and a higher apoptosis in podocytes by an increased Ca^{2+} -influx through gain-of-function TRPC6-channels. The reduced stability of the glomerular slit diaphragm in patients with FSGS will induce proteinuria and results in kidney failure. In the near future these initial results might be confirmed in TRPC6-deficient podocytes expressing gain-of-function mutants of TRPC6 and TRPC6 channels may therefore be attractive novel drug targets for therapeutic intervention in patients with FSGS.

3 Einleitung

Jede menschliche und tierische Zelle wird von ihrer Umgebung, dem Extrazellularraum, durch eine Zellwand abgetrennt. Um die Zellfunktionen zu beeinflussen, muss sie durch Hormone und Wachstumsfaktoren von außen angesteuert werden. Die Zellwand an sich ist undurchlässig für große hydrophile Moleküle, da sie aus einer Doppellipidschicht besteht. Sie hat jedoch diverse Kanäle, um den Austausch von Ionen zu gewährleisten. Der Gradient der Ionenkonzentration bestimmt bei der passiven Diffusion der Ionen durch die Kanäle die Richtung des Ionenstroms. Diese Ionenkanäle können entweder direkt vom Extrazellularraum angesteuert werden (sogenannte ionotrope Rezeptoren) oder durch eine Signaltransduktionskaskade im Intrazellularraum. Diese wird durch das Binden eines Agonisten an einen Rezeptor von außen ausgelöst und verläuft häufig über einige sekundäre Botenstoffe und Enzyme, bis einer von diesen am Ziel der Kaskade den Ionenkanal aktiviert und damit für Ionen öffnet. Diese Rezeptoren werden metabotrope Rezeptoren oder auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genannt. In dieser Arbeit sind die G_q-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Bedeutung.

3.1 Funktion von Calcium in der Zelle

Bindet ein Agonist an einen G_q-Protein-gekoppelten Rezeptor, aktiviert das G-Protein die Phospholipase C- β (PLC β). Diese wiederum kann als Enzym Phosphatidyl-inositol-bisphosphat (PIP₂) spalten, wobei Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) entstehen. DAG ist ein Aktivator einiger TRPC(classical transient receptor potential)-Proteine. Der interne Calciumionenspeicher der Zelle, das endoplasmatische Retikulum (ER), besitzt einen ionotropen Rezeptor, der direkt durch IP₃ geöffnet werden kann.

Da die Calciumkonzentration im ER sehr hoch ist, strömen Calciumionen ins Zytosol. Um das ER wieder zu füllen, werden unselektive Kanäle an der Plasmamembran geöffnet, durch die Ca²⁺-Ionen ins Zytosol gelangen. Solche Kanäle werden als speicheroperiert (SOC = store operated channel) bezeichnet. Calciumionen sind wichtige sekundäre Botenstoffe (sog. Second Messenger) in der Zelle, so aktivieren sie verschiedene Transkrip-

3 Einleitung

tionsfaktoren, die Myosin-Leichtketten-Kinase und die NO-Synthase und können damit direkt diverse Zellfunktionen beeinflussen wie Transkription, Sekretion, Apoptose und Kontraktion. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen muss die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol genau reguliert werden. So pumpen Calciumpumpen des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA = Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) ständig Ca^{2+} -Ionen zurück in die Speicher und erhalten damit die Konzentration von etwa 10^{-7} M im Zytosol.

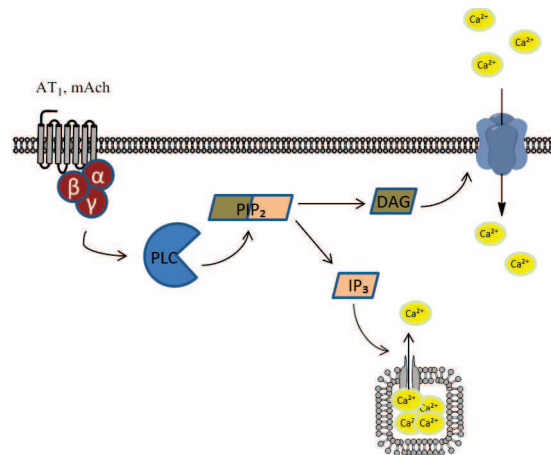


Abbildung 3.1: G_q-Signalweg: AT₁: Angiotensin-Rezeptor 1; mACh: Acetylcholinrezeptor vom Muskarintyp; PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidylinositolbisphosphat; DAG: Diacylglycerol; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat.

TRP-Kanäle haben eine Sonderstellung unter den Calcium durchlässigen Kanälen inne. Sie durchqueren die Plasmamembran sechsmal mit ihren hydrophoben Regionen und besitzen ähnlich wie spannungsabhängige Kanäle eine porenformende Schleife zwischen der 5. und 6. Transmembranregion.

3.2 Funktion der Phospholipasen C

Die Enzymfamilie der Phospholipasen C (PLC) umfasst 13 Mitglieder unterteilt in 6 Unterfamilien (PLCβ, PLCγ, PLCδ, PLCε, PLCζ und PLCη). Alle PLCs besitzen die sogenannten EF-Hand-Motive, Ca²⁺-Ionen binden können, daneben die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) und die C2-Domäne als konservierte Domänen, sowie die katalytisch aktiven X- und Y-Domänen [4].

3 Einleitung

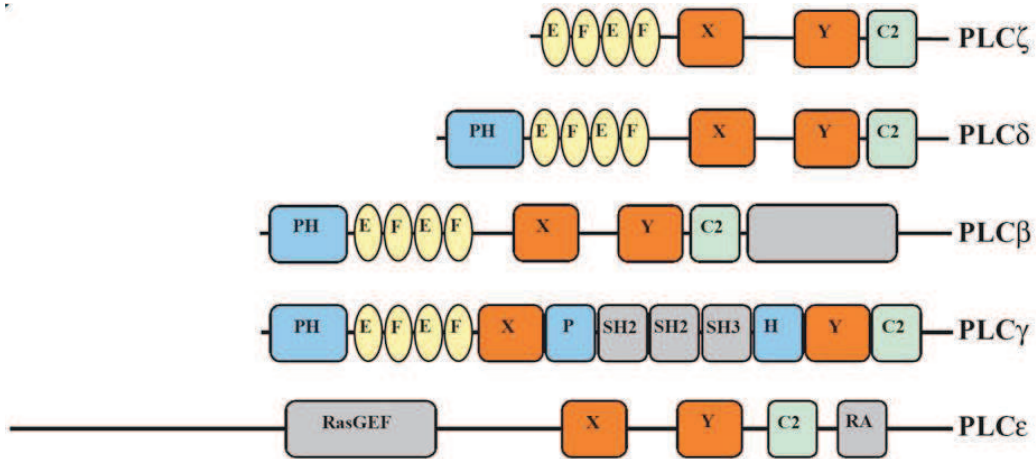


Figure 3.2: Schematischer Aufbau der Phospholipasen (Abbildung übernommen aus [5]). Funktionelle Domänen: EF: EF-Hand-Motive, X, Y: katalytisch aktive Domänen, C2: konservierte C2-Domäne, PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne, SH: SH-Domänen für die Bindung von Tyrosinkinasen, RasGEF: RasGEF-Domäne, RA: Ras-Bindungsmotiv.

Die zentrale Funktion der PLCs ist die Spaltung des Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in die Second-Messenger Moleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (siehe Abbildung 3.3). Während IP_3 durch Binden an die IP_3 -Rezeptoren, die sich in der Membran der intrazellulären Calciumspeicher, z. B. des endoplasmatischen Retikulums, befinden, durch eine Konformationsänderung diese öffnet und intrazelluläre Calciumionen ins Zytoplasma der Zelle entlässt, kann DAG Proteinkinasen C aktivieren und sorgt über die Aktivierung von TRP-Kanälen für einen Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellularraum.

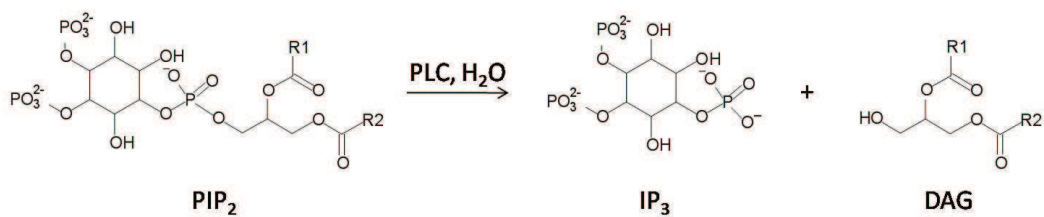


Figure 3.3: Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in die Second-Messenger Moleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) durch Phospholipasen C (PLC).

3 Einleitung

Die Unterschiede zwischen den Unterfamilien der PLCs machen sich in deren Regulation bemerkbar. So werden Phospholipasen des Typs C β durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren gesteuert [6], C γ durch Tyrosinkinasen [7] und bei denen des Typs C δ wird von einer Regulation durch Calcium ausgegangen [8].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der PLC ϵ . Diese ist ein Effektormolekül des Ras Proteins, welches ein GTP-bindendes Protein ist. Ras ist beteiligt an einer Reihe von Zellfunktionen, wie Wachstum, Differenzierung und Onkogenese. Das Ras-Bindungsmotiv (RA) ist in vielen Ras-Effektoren konserviert und besteht aus 100 Aminosäuren. Dieses Motiv wurde zunächst in *C. elegans* [9], aber später auch in Säugern identifiziert [10]. Neben den für die PLCs üblichen Domänen besitzt die PLC ϵ zwei RA-Motive am Carboxyterminus und am Aminoterminal ein Ras-GEF ähnliches Motiv [11]. Die PLC ϵ und die PLC β sind evolutionär verwandt. Die PLC β lässt sich durch α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Dimere stimulieren. Die PLC ϵ kann selbst dann von G α_{12} - und $\beta_1\gamma_2$ -Dimeren aktiviert werden, wenn Ihre RA-Motive deletiert sind [10, 11]. Auch konnte eine direkte Interaktion zwischen Rho-Proteinen, im Speziellen durch die Enzyme RhoA, RhoB und RhoC, und der PLC ϵ gezeigt und eine Bindungsstelle in der Y-Domäne identifiziert werden [12].

Gegenüber einem Mitglied der Ras-Familie, Rap1, wurde eine Nukleotidaustauschaktivität der RasGEF-ähnlichen Domäne der PLC ϵ gezeigt [13]. Studien zur Signaltransduktion ergaben weiterhin, dass die Erhöhung von cAMP über die RapGTPase und PLC ϵ zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führte. Obwohl in einigen Systemen cAMP die PLC-Aktivität durch PKA-abhängige PLC-Phosphorylierung inhibiert, zeigten HEK293-Zellen, die den β_2 -adrenergen Rezeptor exprimierten, nach Adrenalinbehandlung oder Applikation des Adenylzyklaseaktivators Forskolin eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch cAMP. Koexpression einer inaktiven Rap2B-Mutante reduzierte und Überexpression von PLC ϵ steigerte die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Rezeptorstimulation [14]. Diese Resultate im Zusammenhang mit dem Befund, dass PLC ϵ vor allem im Herzen gefunden wird, machen PLC ϵ zu einem pharmakologischen Ziel für Medikamente, die eine übermäßige Adrenalinwirkung auf das Herz inhibieren.

3.3 Entdeckung der TRPs

Vor über vierzig Jahren entdeckten Cosens und Manning [15] bei ihrer Forschung an der Tauffliege *Drosophila Melanogaster* mutierte Tiere. Aufgefallen waren diese aufgrund

3 Einleitung

ihres Verhaltens bei hellem Licht, so schienen sie nahezu blind. Im Dunklen machen *Drosophila* Geräusche, um sich zu orientieren, welche sie im Hellen komplett einstellen. Bei einem Experiment in einem Labyrinth verhielten sich diese mutierten Tiere bei hellem Licht so, wie es sonst bei Dunkelheit üblich ist. Zur Ableitung eines Elektroretinogramms (ERG) wird eine Elektrode in die Photorezeptorzelle der Fliege geschoben, wodurch die elektrische Antwort des Fliegenauges auf Licht aufgezeichnet werden kann.

Das ERG der Mutante zeigt auf helles Licht anfangs einen starken Anstieg, was auf eine Depolarisation der Zelle schließen lässt, doch nach etwa zehn Sekunden geht das Signal zurück auf den Wert vor der Lichtanregung. Bei einem zweiten Lichttest reagiert die Zelle nicht, sie kann sich offensichtlich nur langsam erholen. Bei einer weiteren Mutante bleibt der Anstieg völlig aus, diese Fliege ist also wirklich blind und wird daher als NorpA, für no receptor potential Klon A, bezeichnet. Die Mutante mit dem kurzen, vorübergehenden Signal wurde einige Jahre später als *trp*-Mutante bezeichnet, was für transientes Rezeptorpotential steht [16].

Der Einfall von Licht verursacht eine Konformationsänderung des Rhodopsin, wodurch eine G-Protein Signaltransduktionskaskade gestartet wird. Dieses wiederum aktiviert die Phospholipase C- β und damit lichtaktivierte Kanäle.

Einige Jahre später konnte der *Drosophila* TRP-Kanal kloniert werden. In einer humanen EST-Datenbank (EST = expressed sequence tags) wurde eine entsprechende Sequenz gefunden, mit deren Hilfe der erste menschliche TRP-Kanal kloniert werden konnte. Er wird heute als TRPC1 (TRPC = transient receptor potential classical oder canonical) bezeichnet.

3.4 Die TRP-Familie

Mittlerweile sind diverse TRP-Gene in verschiedenen Spezies bekannt, welche aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und der Homologie ihrer Sequenz in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden können. Die Aktivierung erfolgt bei allen Familienmitgliedern unterschiedlich, wobei diverse sensorische Bereiche abgedeckt werden wie Sehen, Geschmack, Hören, Riechen, Berührung, Temperatur- und Druckempfinden [17]. Hiermit haben die TRP-Proteine wichtige Aufgaben im Organismus und spielen auch bei diversen Krankheitsbildern eine entscheidende Rolle. Die Sequenzhomologie lässt sich gut in einem phylogenetischen Stammbaum darstellen. Die Bezeichnungen der einzelnen Unterfamilien leiten sich jeweils von dem ursprünglichen Namen des zuerst gefundenen Mitglieds jeder Unterfamilie ab.

Der TRPM1-Kanal hieß zuvor Melastatin [18]. Die TRPM-Unterfamilie hat eine Ho-

3 Einleitung

mologie von etwa 20 % zu den TRPCs und besitzt eine TRP-Domäne am C-Terminus der Transmembrandomänen. Der TRPC1 war der erste entdeckte Vertreter der TRPs bei Säugern überhaupt, weshalb seine Unterfamilie als klassisch oder kanonisch bezeichnet wird. Die Aktivierung des TRPV1 erfolgt unter anderem über das Vanilloid Capsaicin. Hier beträgt die Homologie zwischen den Familienmitgliedern sogar 25 %. ANKTM1 war der vorherige Name des TRPA1-Proteins, da dieses besonders viele N-terminale Ankirin-Domänen besitzt. Bei Mensch und Maus existiert nur dieser eine Vertreter der Gruppe.

3 Einleitung

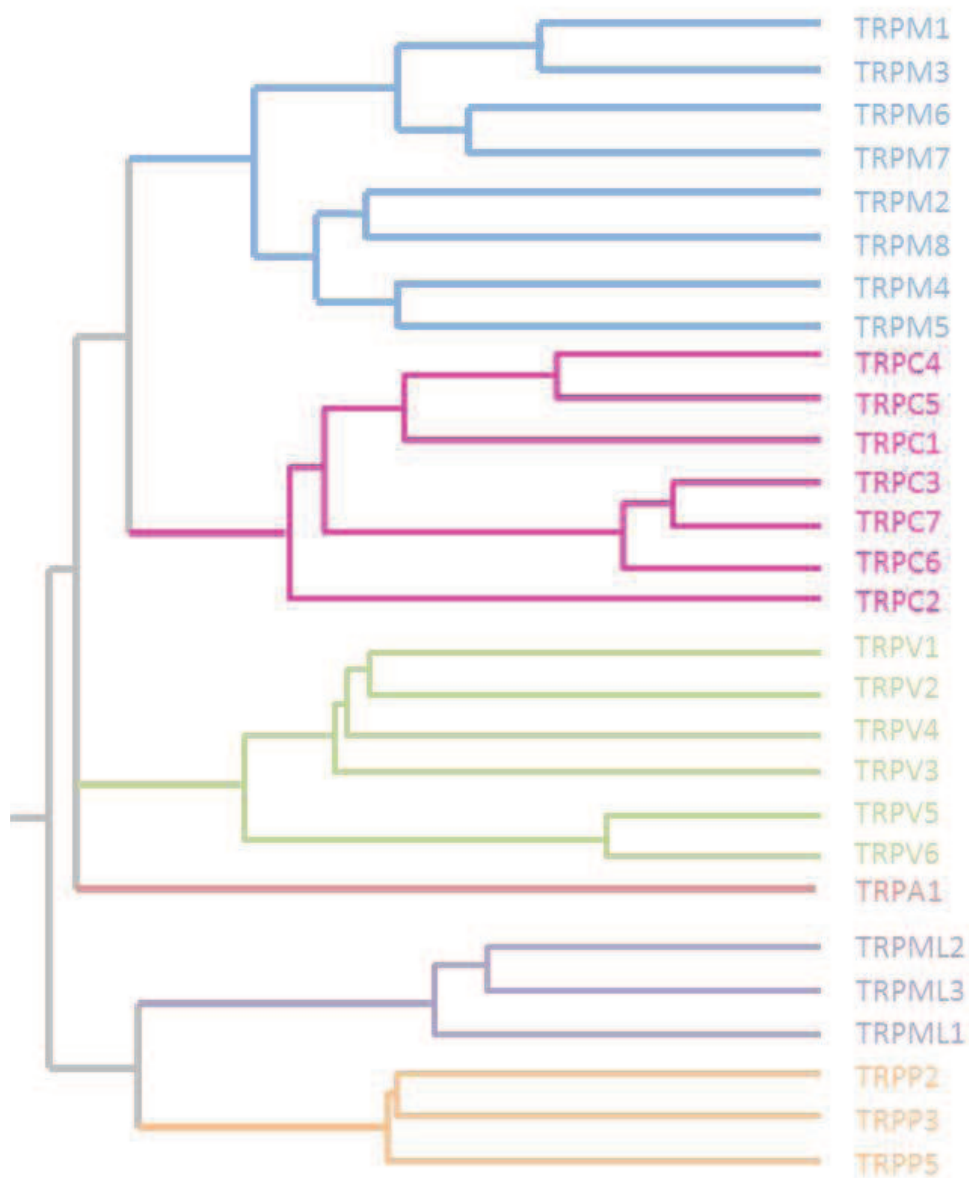


Abbildung 3.4: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie in Säugern [19, 20]. Die Länge der Äste stellt dabei die evolutionäre Entfernung von benachbarten Proteinen dar. Die einzelnen TRP-Familien sind farblich gekennzeichnet.

Der TRPML1 war zuvor als mucolipin-1 oder auch MCOLN1 bekannt. Bei den TRPML und TRPP-Proteinen ist die Homologie geringer. Letztere haben ihren Namen von dem TRPP2, der einst als polycystin-2 oder PKD2 bezeichnet wurde. Der schematische Auf-

3 Einleitung

bau der einzelnen Unterfamilien wird in Abbildung 3.5 an jeweils einem Vertreter gezeigt.

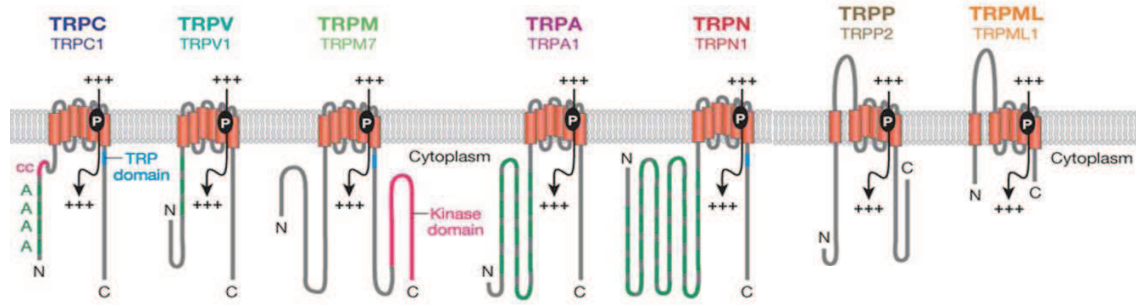


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau der TRPs. Jeweils ein Familienmitglied ist exemplarisch gezeigt [aus 17].

Der TRPN1 kommt weder bei Menschen noch bei Mäusen vor und erhielt seinen Namen von dem *Drosophila* Protein NOMPC. Die TRPs von Menschen und Mäusen unterscheiden sich nur beim TRPC2-Protein, das beim Menschen nur als Pseudogen vorkommt.

	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
TRPC	3	3	7	6
TRPV	5	2	6	6
TRPM	4	1	8	8
TRPA	2	4	1	1
TRPN	1	1	0	0
TRPP	1	1	3	3
TRPML	1	1	3	3
Gesamt	17	13	28	27

Tabelle 3.1: Anzahl der TRP-Gene in verschiedenen Spezies [aus 17].

Alle Vertreter der TRPs besitzen sechs Transmembrandomänen, wobei zwischen der Fünften und Sechsten eine porenformende Schleife zu finden ist. Wie auch bei spannungsabhängigen Ionenkanälen bilden die Porenschleifen von vier Monomeren die zentrale Pore des Tetramers. Es wurden sowohl Homo- als auch Heterotetramere mit zwei oder aber auch mit drei unterschiedlichen Untereinheiten identifiziert. Sowohl C- als auch N-Terminus sind im Inneren der Zelle lokalisiert. Die meisten TRP-Kanäle sind unselektiv und damit für viele Ionen durchlässig. Dabei werden mehr als zehnmal so viele Natrium- wie Calciumionen durchgeschleust. Ausnahmen bilden TRPM4 und TRPM5, die nur monovalente Ionen durchlassen und die calciumselektiven Kanäle TRPV5 und TRPV6

3 Einleitung

[20]. Die Selektivität der Kanäle wird durch die Membranregion, bestehend aus der fünften und sechsten Transmembrandomäne, festgelegt, welche auch an der Steuerung des Öffnungsmechanismus beteiligt ist [20]. Die meisten TRPs haben eine hochkonservierte TRP-Box am C-Terminus mit der Aminosäuresequenz EWKFAR. Am N-Terminus sind häufig mehrere Ankirindomänen, welche aus je 33 Aminosäuren bestehen. Es wird vermutet, dass sie für die Interaktion zwischen Proteinen verantwortlich sind, so zum Beispiel bei der Heteromerisierung von TRPC1 und TRPC3 [21]. Für die Tetramerisierung und Dimerisierung von Proteinen sind außerdem die Coiled-coil Domänen zuständig [22]. Da die TRPC1- und TRPC6-Kanäle Gegenstand dieser Arbeit sind, werden im Folgenden die Eigenschaften der TRPC-Familie näher erläutert.

3.5 Die TRPC-Unterfamilie

Die Familie der TRPCs besteht aus sieben Mitgliedern, von denen jedoch nur sechs beim Menschen vertreten sind. TRPC2 gilt im Menschen als Pseudogen und ist somit nicht funktionell. Die TRPCs haben die höchste Homologie zu den Namensgebern der TRPs, TRP und TRPL. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie werden die TRPCs in drei Subfamilien unterteilt, C4/C5/C1, C3/C7/C6 und C2, wie auch in Abbildung 3.6 zu erkennen ist.

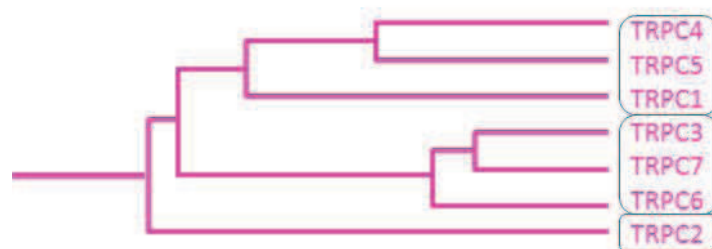


Abbildung 3.6: Phylogenetischer Stammbaum der TRPC-Familie in Säugern. Die Länge der Äste stellt dabei die evolutionäre Entfernung von benachbarten Proteinen dar.

TRPC-Proteine sind in der Lage funktionelle Ionenkanäle zu bilden, hierzu werden immer vier Proteine benötigt. Es gibt sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere mit zwei oder drei unterschiedlichen TRPCs. Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, dass nur Heterotetramere innerhalb einer der drei Untergruppen möglich wären [23].

3 Einleitung

Jedoch wurden mittlerweile diverse heteromere Kanäle in nativen Geweben identifiziert. Vor allem der TRPC1-Kanal, für den bisher keine Homotetramere in der Plasmamembran nachgewiesen wurden, kann mit allen anderen TRPC Monomeren heterotetramere Komplexe mit drei unterschiedlichen Monomeren bilden [24]. Es wird angenommen, dass er als eine Art "linker"-Molekül zwischen den Untergruppen fungiert [24].

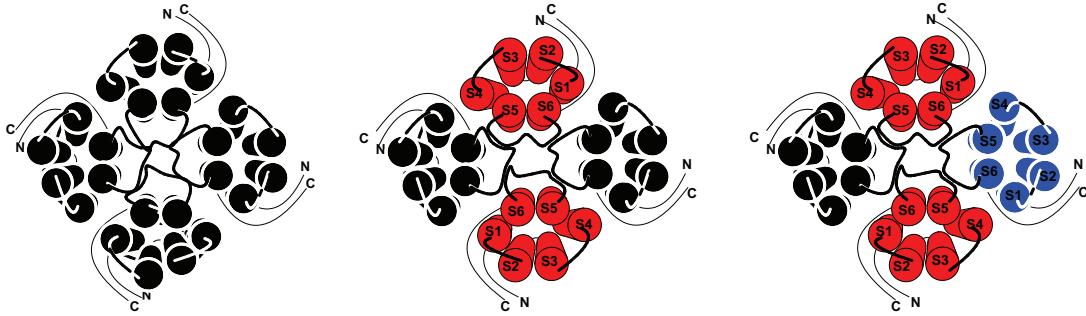


Abbildung 3.7: Bildung von TRPC-Kanal Homo- und Heterotetrameren aus gleichen oder verschiedenen Kanalmonomeren.

Die Aktivierung der TRPCs ist noch nicht endgültig geklärt. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten. Die Kanäle können Speicher- oder Rezeptor-operiert sein und werden dann als SOC (= "store operated channel") oder ROC (= "receptor operated channel") bezeichnet [25].

Bei SOCs wird der Einstrom der Calciumionen durch die Kanäle zunächst durch die Entleerung der internen Calciumspeicher induziert. Die Speicherentleerung kann beispielsweise durch Inhibieren der SERCA-Pumpe (SERCA = smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase) am Endoplasmatischen Reticulum (ER) erreicht werden, die normalerweise einen Calciumionenüberschuss im Zytosol zurück ins ER pumpt. Momentan wird vermutet, dass nicht die TRP-Kanäle, sondern die kürzlich entdeckten Orai-Kanäle speicheroperiert aktiviert werden können [26]. Einige Arbeitsgruppen berichten aber von Interaktionen der TRPC-Kanäle mit den Orai-Kanälen [27] oder seinem Calciumsensor STIM1 [28].

ROCs hingegen werden durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Phospholipasen aktiviert, welche PIP_2 in IP_3 und DAG spalten und Mitglieder der TRPC3/6/7 Subfamilie aktivieren können [29].

TRPC1

Der TRPC1-Kanal wurde anfangs unter dem Namen TRP1 bekannt. Er kommt in Herz, Hirn, Lunge und Leber und in geringerer Konzentration auch in Milz, Niere und

3 Einleitung

Hoden vor [30]. Seine physiologischen Aufgaben sind umstritten. Es wird vermutet, dass er bei der Entwicklung des Gehirns, beim Schlaf-/Wachrhythmus und beim Körpergewicht eine Rolle spielt [31]. Als erstes Mitglied der Säuger-TRPCs wurde der TRPC1 zunächst für einen Ionenkanal gehalten [32], der speicheroperiert oder dehnungsaktiviert ist [32]. Allerdings wurden bis heute keine homotetrameren TRPC1-Kanäle in der Plasmamembran gefunden [33]. Nach heterologer Überexpression von TRPC1 allein konnten keine spezifischen Ströme gemessen werden [34]. Allerdings zeigen die TRPC4- und TRPC5-Ströme deutliche Veränderungen, wenn in HEK293-Zellen TRPC1 koexprimiert wird (siehe Abbildung 3.8, 3.9 und [34]).

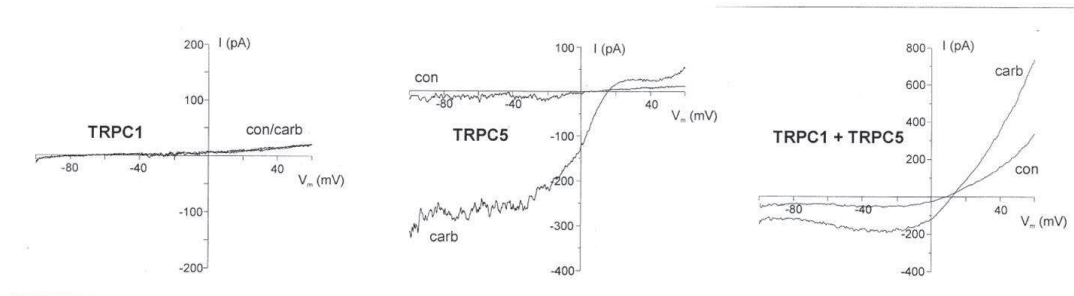


Abbildung 3.8: Elektrophysiologische Messungen (Strom-Spannungskurven) von TRPC-Kanälen im Überexpressionsmodell in HEK293-M1-Zellen (HEK293-Zellen, welche stabil den muskarinergen M1-Rezeptor exprimieren [35]). Graphik übernommen von Strübing et al. [34]. Con: Kontrolle vor Carbachol-Zugabe, carb: Ströme nach Zugabe von 20 μ M Carbachol.

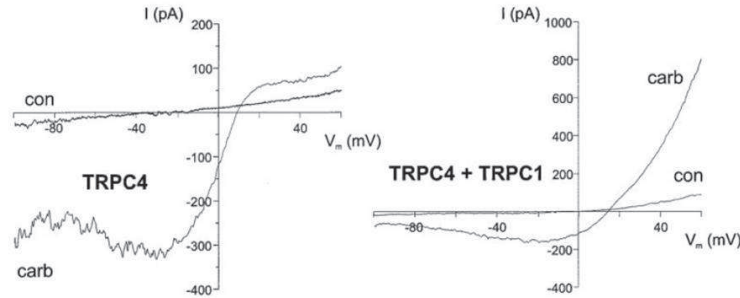


Abbildung 3.9: Elektrophysiologische Messungen (Strom-Spannungskurven) von TRPC-Kanälen im Überexpressionsmodell in HEK293-M1-Zellen (HEK293-Zellen, welche stabil den muskarinergen M1-Rezeptor exprimieren [35]). Graphik übernommen von Strübing et al. [34]. Con: Kontrolle vor Carbachol-Zugabe, carb: Ströme nach Zugabe von 20 μ M Carbachol.

3 Einleitung

TRPC1 kann mit TRPC4 oder TRPC5 aus heteromeren Kanalkomplexen koimmunpräzipitiert werden [33] und es wurden auch Komplexe mit TRPC1, TRPC4 oder TRPC5 und TRPC3, TRPC6 oder TRPC7 beschrieben [34].

TRPC2

Der TRPC2-Kanal hat eine Sonderrolle bei den TRPCs, da er beim Menschen nur als Pseudogen vorhanden ist. Eine TRPC2-Expression konnte bei Ratten und Mäusen vor allem im Vomeronasalorgan nachgewiesen werden [36, 37]. Der Phänotyp von TRPC2-defizienten Mäusen zeigt sich in einer gestörten Pheromon-Wahrnehmung, die über das Vomeronasalorgan gesteuert wird. Diese Mäuse können offensichtlich das Geschlecht ihrer Artgenossen nicht erkennen [38, 39], so dass männliche Mäuse versuchen mit männlichen Artgenossen zu kopulieren.

TRPC3

Die Expression des TRPC3-Kanals konnte vor allem in der Hirnanhangdrüse, aber auch in anderen Teilen des Gehirns, in Herz und Lunge gezeigt werden [40]. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie gehört TRPC3 mit TRPC6 und TRPC7 zu einer Unterfamilie. Diese Proteine können miteinander heterotetramere Ionenkanäle ausbilden, welche durch DAG aktiviert werden und schwach selektiv für Natrium- und Calciumionen sind [41]. In Ratten konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPC3 im Zentralnervensystem vor allem kurz vor und nach der Geburt besonders stark ausgeprägt ist [42]. In den Neuronen, in denen TRPC3 exprimiert wird, kann auch die Expression von TrkB beobachtet werden, einem Rezeptor, der durch BDNF (brain-derived nerve growth factor) aktiviert wird. Die physiologische Funktion von TRPC3 konnte in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns gezeigt werden, in denen der TRPC3 am stärksten von den TRPC-Kanälen exprimiert ist. Bei TRPC3-defizienten Mäusen fehlen sowohl die langsamen exzitatorischen postsynaptischen Potentiale als auch die mGluR-vermittelten (mGluR = metabotroper Glutamat Rezeptor) Einwärtsströme [43].

TRPC3 interagiert mit verschiedenen TRP-Proteinen. So wurde beispielsweise eine Interaktion von TRPC3 mit TRPC6 identifiziert. Durch eine Koexpression von TRPC3 mit einem dominant negativen TRPC6 in CHO-K1 Zellen konnte das TRPC6 Signal unterdrückt werden [23].

Das TRPC3-Protein kann jedoch auch als homotetramerer Kanal gefunden werden. In Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass der TRPC3-Kanal an der extrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne einfach glykosyliert ist [44] und es gelang durch Einführen einer weiteren Glykosylierung an der extrazellulären

3 Einleitung

Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne am TRPC3-Protein, ähnliche Kanaleigenschaften wie beim doppelt-glykosilierten TRPC6-Kanal nachzuweisen [45].

TRPC4

Der TRPC4-Kanal wird vor allem in Herz, Pancreas, Prostata, den Nebennieren und der Placenta exprimiert [46]. TRPC4 und TRPC5 weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf und werden daher in einer Untergruppe zusammengefasst. Wie zuvor erwähnt, sind beide Proteine in der Lage, mit dem TRPC1 heteromere Kanäle zu bilden [34]. In Endothelzellen von Wildtyp-Mäusen konnte ein speicheroperierter Calciumionen-Einstrom gezeigt werden, der in Endothelzellen von TRPC4-/- -Tieren fehlt [47]. Ebenfalls konnte dieselbe Forschergruppe zeigen, dass ein agonistinduzierter ROC nur bei den Wildtyp-Zellen zu verzeichnen war. Auch eine Vasodilatation von Aortenringen mit Acetylcholin, die ebenfalls von den Endothelzellen abhängig ist, war bei den gendefizienten Tieren verändert. Die Sekretion von GABA (γ -aminobutyric acid) im ZNS über Aktivierung des 5-HT₂-Rezeptors ist bei TRPC4-defizienten Tieren vermindert [48]. Neuerdings konnte auch eine Beteiligung von TRPC4 an bestimmten Epilepsieformen nachgewiesen werden [49].

TRPC5

Zunächst wurde der TRPC5 ausschließlich im Hirn beschrieben [50]. In Neuronen des Hippocampus wird er zusammen mit dem TRPC4 gefunden [51]. Außerdem wird die Wachstumsgeschwindigkeit von sich entwickelnden Neuriten durch TRPC5 reguliert. Vor kurzem konnte auch die Expression in nicht neuronalen Zellen nachgewiesen werden und Resveratrol wurde als spezifischer TRPC5-Kanalinhibitor beschrieben [52].

TRPC6

Der TRPC6-Kanal wird nahezu im gesamten Körper exprimiert, vor allem jedoch im Hirn, im glatten Muskelgewebe, in Immun- und in Blutzellen [53, 54]. Wie zuvor erwähnt, kann der TRPC6-Kanal mit TRPC3 und TRPC7 zu einer Subfamilie gezählt werden. Wie auch der TRPC7-Kanal und heteromere TRPC3/6/7-Kanäle können auch homomere TRPC6 Kanäle durch DAG aktiviert werden. Die Kanalöffnung führt zu einem nichtselektiven Ioneneinstrom. Neben den heteromeren Kanälen innerhalb der Subgruppe konnten mittlerweile ebenfalls heteromere Kanäle mit TRPC1, TRPC4 oder TRPC5 gezeigt werden, jedoch nur im embryonalen und nicht im adulten Hirn [24]. Wie die anderen TRPC-Kanäle auch hat der TRPC6 sechs Transmembrandomänen. Außerdem hat

3 Einleitung

der TRPC6-Kanal zwei Glykosylierungsstellen an der ersten und zweiten extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen S1 und S2 sowie zwischen S3 und S4 [45]. Dem TRPC6-Protein werden diverse physiologische Funktionen zugeschrieben. Es konnte beispielsweise durch Inhibition von TRPC6 in Zellen des Plattenepithelkarzinoms deren Proliferation unterdrückt werden [55]. Außerdem spielt der TRPC6-Kanal eine Rolle bei der hypoxievermittelten pulmonalen arteriellen Vasokonstriktion [56]. Es konnte gezeigt werden, dass bei isolierten Lungen von WT-Mäusen der pulmonale Druck der Arterien auf Applikation von OAG steigt, wohingegen bei Lungen TRPC6-defizienter Mäuse kein Effekt nachgewiesen werden konnte [57]. Darüber hinaus wurde eine Überaktivität des TRPC6-Kanals als eine Ursache der Nierenkrankheit fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) identifiziert (siehe unten und [58]).

TRPC7

Auch TRPC7 wird direkt über DAG aktiviert und ist ein rezeptoroperierter DAG-sensitiver Ionenkanal [59]. Er wird beim Menschen hauptsächlich im ZNS, aber auch in der Hirnanhangdrüse und der Niere und in geringen Mengen auch im Darm, in der Prostata und in Knorpeln exprimiert [40]. Interessanterweise scheint beim TRPC7 die Aktivierung davon abhängig zu sein, ob dieser transient oder stabil in HEK293-Zellen exprimiert wird [40, 60]. Bisher gibt es noch keine TRPC7-defiziente Maus, jedoch konnte durch Ausschalten des Kanals in der DT40 B-Zelllinie eine Verringerung des Calciumeinstroms sowohl über einen SOC als auch über einen ROC gezeigt werden [61].

3.6 Nieren- und Podozytenfunktion

Die Niere ist ein stark durchblutetes Organ, in der pro Tag etwa 120 Liter Primärharn abgepresst werden. Da es nicht möglich wäre, diese enorme Menge an Wasser und Salzen über die Nahrung wieder auszugleichen, wird der Primärharn aufkonzentriert. Zuerst gelangt das Blut in die Kapillarschlingen der Glomeruli in der Bowman'schen Kapsel der Niere. Dort wird das Blut gegen eine dreiteilige Filterbarriere, die im nächsten Abschnitt im Detail beschrieben wird, gepresst. Der Primärharn wird im Kapselraum der Bowman'schen Kapsel aufgefangen und von dort in den proximalen Tubulus bis in die Henlesche Schleife geleitet. Hier wird der Harn aufkonzentriert, erreicht den distalen Tubulus und schließlich das Sammelrohr und kann dann ausgeschieden werden.

Eine weitere Aufgabe der Niere ist die Sekretion von Abfallprodukten, die beispielsweise bei der Metabolisierung von Medikamenten entstehen. Auch wird sowohl der Säure-Basen-Haushalt als auch der Blutdruck des Körpers durch die Niere reguliert.

Podozytenfunktion

Die zuvor erwähnte Filterbarriere in der Bowman'schen Kapsel soll verhindern, dass Proteine aus dem Blut in den Urin gelangen. Sie besteht aus drei Schichten, die unterschiedliche Aufgaben haben. Auf der Blutseite liegt zunächst ein fenestriertes Endothel, darauf die glomeruläre Basalmembran (GBM) und auf dieser, dem Harn zugewandt, die Podozyten mit ihren Fußfortsätzen [62].

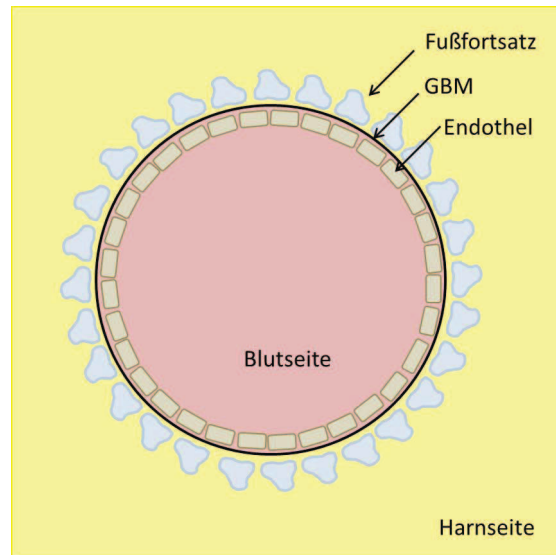


Abbildung 3.10: Querschnitt durch eine Kapillarschlinge in der Bowman'schen Kapsel.

Alle drei Schichten sind stark negativ geladen, so dass negativ geladene Proteine nicht passieren können. Außerdem bilden alle drei Schichten eine mechanische Barriere mit unterschiedlicher Porengröße. Das Endothel hat breite, bis zu 100 nm fassende Fenster, die große Proteine und Blutzellen zurückhalten und damit einen Vorfilter darstellen. Die GBM bildet die Verbindung zwischen dem Endothel und den Podozyten. Die Podozyten sind Epithelzellen mit besonders ausgeprägten Fußfortsätzen, die ineinander greifen und eine sog. Schlitzmembran ausbilden. Die entstehenden Poren haben eine Größe von 5 nm und können nur niedermolekulare Substanzen durchlassen.

Podozyten können sowohl durch mechanische Kräfte über das mechanosensitive Protein Podocin als auch über Rezeptoraktivierung zum Verschluss der Schlitzmembran beitragen. Eine Erhöhung des Blutdrucks durch vermehrte Produktion von Angiotensin II kann so auch die Podozyten durch Aktivierung ihres AT_1 -Rezeptors veranlassen, die Schlitzmembran weiter zu verschließen, um dem erhöhten Druck im Glomerulus besser standhalten zu können.

Fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Die fokale segmentale Glomerulosklerose ist eine Krankheit der Niere. Im Verlauf einer FSGS tritt bei dem Patienten ein erhöhter Gehalt an Protein im Urin auf (Proteinurie), da durch die Filtration im Glomerulus nicht mehr alle Proteine im Blut zurückhalten werden können. Fokal bedeutet an dieser Stelle, dass nur einige der Glomeruli betroffen sind, während segmental für eine nur beschränkte Ausbildung innerhalb der betroffenen Glomeruli steht. Eine Sklerose beschreibt schließlich das Vernarben von Gewebe (zusammengefasst in [63]). Häufig führt die FSGS zum nephrotischen Syndrom, welches sich durch das Vorhandensein von diversen Proteinen im Urin zeigt, was auf eine verstärkte Durchlässigkeit des Glomerulus für große Moleküle zurückzuführen ist. Neben einem Mangel bestimmter Eiweiße im Blut führt die FSGS damit letztlich auch zur Niereninsuffizienz [64].

Mutationen und bisherige Daten

Bei vielen Patienten mit einer vererbten Form der FSGS sind Mutationen im TRPC6-Kanal [2, 1] und der Phospholipase C- ϵ (PLC ϵ) [3] identifiziert worden. Während es sich bei den TRPC6-Mutationen um sogenannte "gain-of-function" Mutationen handelt, die eine Erhöhung der Kanalaktivität bedingen, führen die Mutationen in der PLC ϵ zu einem katalytisch inaktiven Enzym. Während die PLC ϵ -Mutationen bereits bei Kindern FSGS-ähnliche Symptome auftreten lassen, zeigen Patienten mit TRPC6-Mutationen erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr Symptome. Eine Ausnahme bildet die TRPC6-Mutation M132T (Austausch des Methionins 132 durch ein Threonin), die bei einem Kind bereits Symptome auslöst und zu einem bis zu zehnfach erhöhten Einwärtsstrom führt [65].

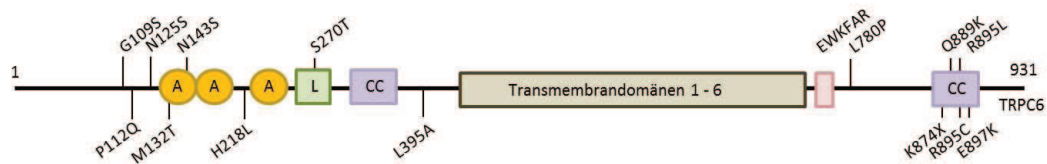


Abbildung 3.11: Lokalisationen der bekannten Patientenmutationen im TRPC6-Kanalprotein. A: ankyrin repeat; L: lipid/trafficking domain; CC: coiled-coil domain; EWKFAR: konservierte TRP-Box. Die Buchstaben stehen für Aminosäuren, die Zahlen geben die Position an, an der die vordere gegen die hintere Aminosäure ausgetauscht ist, X steht für ein Stopp-Codon, was ein trunkiertes Protein bedingt. Abbildung modifiziert nach [58].

3 Einleitung

Mutation	Alter der Patienten in Jahren beim Auftreten der Krankheit	Lit.
P112Q	18 - 56	[2]
R895C	18 - 46	[1]
E897K	24 - 35	[1]
N143S	27 - 39	[1, 66]
S270T	17 - 52	[1, 66]
K874*	27 - 57	[1, 66]
Q889K	35 - 41	[67]
G109S	17 - 57	[68]
N125S	17 - 57; 4 - 14	[68, 69]
L780P	17 - 57	[68]
M132T	9 - 30	[65]
H218L	8	[69]
R895L	2	[69]
L395A	2	[70]

Tabelle 3.2: Mutationen im TRPC6-Kanalprotein.

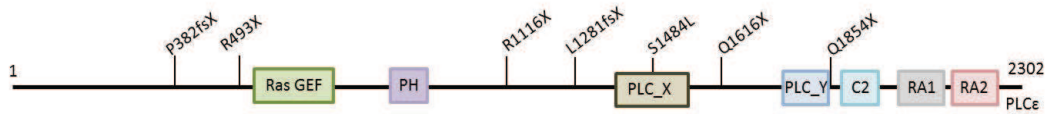


Abbildung 3.12: Lokalisationen der bekannten Patientenmutationen der PLCε. RasGEF: guanine nucleotide exchange factor für Ras-ähnliche kleine GTPasen; PH: pleckstrin homology; PLC_X: Phospholipase C katalytische Domäne X-Teil; PLC_Y: Phospholipase C katalytische Domäne Y-Teil; C2: Proteinkinase C konservierte Region, Untergruppe 2; RA1: RasGTP Bindedomäne 1; RA2: RasGTP Bindedomäne 2. Die Buchstaben stehen für Aminosäuren, die Zahlen geben die Position an, an der die vordere gegen die hintere Aminosäure ausgetauscht ist, X steht für ein Stopp-Codon, was ein trunkiertes Protein bedingt. Abbildung modifiziert nach [3].

3 Einleitung

Mutation	Alter der Patienten in Jahren beim Auftreten der Krankheit	Lit.
P382fsX387	< 1	[3]
R493X	< 1	[3]
R1116X	2 - 4	[3]
L1281fsX1308	< 3	[3]
S1484L	< 9	[3]
Q1616X	< 3	[3]
Q1854X	< 1	[3]

Tabelle 3.3: Mutationen in der PLC ϵ

Interessanterweise wurden auch Mutationen in anderen Proteinen des Podozyten wie z. B. Nephtrin, Podocin, CD2AP, α -Actinin-4, WT1 und Laminin β 2 [71] in FSGS-Patienten identifiziert.

Die meisten Versuche zur Erforschung der Podozytenfunktionen im Zusammenhang mit TRPC6 wurden an differenzierten Podozyten aus einer stabilen Zelllinie durchgeführt [72]. Hierbei konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass AngII die Expression von TRPC6-mRNA in Podozyten hochreguliert [73]. In derselben Veröffentlichung wurde auch gezeigt, dass durch Infusionen mit AngII in vivo die Proteinexpression von TRPC6 erhöht wird. Interessanterweise entwickelten TRPC6-defiziente Mäuse, die vier Wochen lang eine Infusion mit Angiotensin II bekamen, eine deutlich reduzierte Albuminurie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, was die Vermutung bestätigt, dass TRPC6-Aktivität eine Proteinurie begünstigen kann [74]. Warum das so ist, bleibt jedoch noch unklar. In einem anderen Labor wurde gezeigt, dass der Wachstumsfaktor TGF- β 1 bei Podozyten Apoptose auslöst, und dass dieser Effekt bei TRPC6-defizienten Zellen abgeschwächt ist [75]. Hier wurden allerdings small interference RNAs (siRNAs) verwendet, die spezifisch die TRPC6 mRNA herunterregulieren können. Ein anderes Forscherteam wiederum konnte in Podozyten aus der stabilen Zelllinie eine verminderte Bildung von Stressfasern in TRPC6-defizienten Zellen feststellen [76].

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Fortführung der Analyse der TRPC1-Funktion, wie sie bereits während der Diplomarbeit begonnen wurde. Dazu wird die murine TRPC1-cDNA aus dem Mausgewebe kloniert und das TRPC1-Protein heterolog überexprimiert und

3 Einleitung

funktionell untersucht. Es sollen insbesondere wichtige Erkenntnisse zur Größe, Lokalisation und zum Heteromerisierungspotentials des TRPC1 gewonnen werden.

Das zweite große Thema dieser Arbeit ist es, den Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Funktion der Podozyten zu untersuchen. Es wurde berichtet, dass einige Patienten, die an FSGS erkrankt sind, eine Mutation in ihrer TRPC6-DNA haben. Da FSGS häufig durch eine Fehlfunktion der Podozyten bedingt ist, liegt der Verdacht nahe, dass der TRPC6 eine wichtige Rolle in der physiologischen Funktion dieser Zellen spielt. Da fast die gesamte Forschung auf diesem Gebiet bisher mit differenzierten Podozyten aus einer stabilen Zelllinie durchgeführt wurde, sollen hier primäre Podozyten von WT-, PLC ϵ -, TRPC6- sowie TRPC6/PLC ϵ -defizienten Mäusen isoliert und diese mit diversen Methoden untersucht werden. Dazu zählen die Messung des Calciumeinstroms nach Applikation des Agonisten Angiotensin II zur Aktivierung des AT $_1$ -Rezeptors und die Analyse der Veränderungen im Zytoskelett der primären Podozyten. Es sollen ebenfalls die Proliferations- sowie die Apoptoseeigenschaften der Zellen untersucht werden. Zusätzlich wird die Signaltransduktionskaskade vom Angiotensin 1-Rezeptor bis zur Aktivierung des TRPC6-Kanals im Detail mit pharmakologischen und molekularbiologischen Methoden in Podozyten und im heterologen Überexpressionssystem aufgeklärt.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Bei Prozentangaben sind grundsätzlich Gewichtsprozent gemeint.

4.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien (DMSO, NaN ₃ , NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , KOH, Rotiphorese 30, BSA, SDS, Glycerin, Rotiblock, Glycin, EDTA, EGTA, DOC, TWEEN 20, Propidiumiodid, β Mercaptoethanol, Bromphenolblau, CaCl ₂ , RNase A, Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O, TEMED, APS, K ₂ S ₂ O ₅ , Trypton, MgCl ₂ , MgSO ₄ , Hepes, MnCl ₂ , Glukose)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe
Lösungsmittel (EtOH, MeOH, AcOH, Isopropanol)	Riedel-de-Haen, Seelze Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Ziegenserum	PAA, Cölbe
Triton X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Carl Roth, Karlsruhe
Entwickler DOKUMOL	TETENAL AG, Norderstedt
Nonidet P40	Calbiochem, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Peqlab, Erlangen
TRIS Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	ACROS Organics, Geel, Belgien
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxycholat	Fluka, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Tabelle 4.1: Standardchemikalien.

4 Material und Methoden

DAPI	Fluka, Sigma-Aldrich, Deisenhofen	32670
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe	K028-3
Protein A Sepharose (Sepharose Beads)	Pierce, Rockford, USA	#20421
Immobilized Neutravidin Protein	Pierce, Rockford, USA	#29200
Proteinkinase K	Roche, Basel, Schweiz	14306700
Carbachol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	C4382
Isofluran	Baxter, Deerfield, USA	0670308
Protease Inhibitor Complete Tab Mini	Roche, Basel, Schweiz	04693124001
EZ-Link Sulfo NHS Biotin (Sulfosuccinimidyl 2-(Biotinamido)Ethyl 1,3'Dithiopropionate)	Pierce, Rockford, USA	#21331
Angiotensin II	Calbiochem, Darmstadt	05-23-0101
Fura-2-AM	Fluka, Sigma-Aldrich, Deisenhofen	47989
1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	Calbiochem, Darmstadt	495414
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	T5391
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	H0135
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	S9133
Normocin	Invivogen, San Diego, USA	#ant-nr-2
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	I9278
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	T6522

Tabelle 4.2: Spezielle Chemikalien.

4.1.2 Enzyme, Kits, Marker

NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren	740412.50
Gene-JET TM Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot	K0503
TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA	K4800-01
GFP Fusion TOPO TA Expression Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA	K4820-01
SV40 Plasmid	Didier Trono, Cambridge, USA	
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA	34080
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA	1859022
Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot	SM0671
DNA Marker Gene Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot	SM0321, SM0311
DNA Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot	R0611
ABsolute SYBR Capillary Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA	AB-1285/B
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot	#K1631
PCR-Reagenzien (Puffer, Taq Polymerase, dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot	divers
High Fidelity Polymerase Phusion, HF Puffer	Finnzymes, Vantaa, Finnland	F-530S
Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay	Invitrogen, Carlsbad, USA	C10245
Annexin Kit Alexa Fluor [®] 488 annexin V	Invitrogen, Carlsbad, USA	V13245
CaspaseGlo 3/7	Promega, Madison, USA	G8090
WST-Assay	Roche, Basel, Schweiz	11644807001
T4 DNA Ligase, Ligase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot	EL0014
Restriktionsenzyme, Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot	divers
Trifast	Peqlab, Erlangen	30-2010
RNA-Kit	Strattec, Berlin	1060100200
TransIT-LT1	MirusBio, Wisconsin, USA	MIR 2300
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA	11668-019
Polybrene	Millipore, Billerica, USA	TR-1003-G

Tabelle 4.3: Enzyme, Kits, Marker.

4.1.3 Geräte

Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Zellkulturmikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Proteine	Hoeffer, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
Blotkammer Proteine	Bio RAD, Hercules (CA)
CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sterilbänke	HeraSafe, Heraeus, Hanau
Pipetten	Gilson, Middleton, WI (USA)
Zentrifugen Rotana / R Mikro 22R Mikro 20 5417 R	Hettich, Tuttlingen Eppendorf, Hamburg
ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Electric Cell-Substrate Impedance Sensing ECIS TM	Ibidi, Martinsried
Viktor ³	Perkin Elmer, Waltham, USA
IMPLEN Nano Photometer	IMPLEN, München
Agarosegel Elektrophorese	Peqlab, Erlangen
Agarosegel Dokumentation	Peqlab, Erlangen
PCR Cycler	Peqlab, Erlangen
Light Cycler 480	Roche, Basel, Schweiz
Bakterieninkubator	Thermo Scientific, Rockford, USA
Nucleofector	Amaxa/LONZA, Basel, Schweiz
NEON	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fluostar Omega	BMG Labtech, Offenburg
Zellsiebe	Retsch GmbH, Haan

Tabelle 4.4: Geräte.

4.1.4 Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Materialien: Petrischalen, Auslaufpipetten, Mehrlochplatten	Sarstedt, Nümbrecht Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
X-OMAT UV-Film	Kodak, Stuttgart
Mattrand Objektträger	Meinzel, Marienfeld
Glasdeckplättchen	Meinzel, Marienfeld
Nitrozellulosemembran PROTRAN	Whatman GmbH, Dassel
Whatmanpapier	Whatman GmbH, Dassel
Impedanz-Array 8W10E	Ibidi, Martinsried
PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 4.5: Verbrauchsmaterial.

4.1.5 Standardlösungen und Puffer**4.1.5.1 PBS (Phosphate Buffered Saline)**

Für den zehnfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt.

80,0 g	NaCl [1,370 M]
2,0 g	KCl [27 mM]
14,4 g	Na ₂ HPO ₄ [101 mM]
2,4 g	KH ₂ PO ₄ [18 mM]

4.1.5.2 PBST

Dem zuvor beschriebenen PBS wurde 0,5 % TWEEN zugegeben.

4.1.5.3 4-fach Tris/SDS Puffer pH 6,8

Für den vierfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen, aufgelöst, der pH-Wert auf 6,8 eingestellt, mit dest. H₂O auf 100 mL aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt.

4 Material und Methoden

6,05 g Tris Base [500 mM]
40,00 mL dest. H₂O
0,40 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [14 mM, 0,4 %]

4.1.5.4 4-fach Tris/SDS Puffer pH 8,8

Für den vierfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen, aufgelöst, der pH-Wert auf 8,8 eingestellt, mit dest. H₂O auf 500 mL aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt.

91 g Tris Base [1,500 M]
300 mL dest. H₂O
2 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [14 mM, 0,4 %]

4.1.5.5 2-fach Laemmli (Ladepuffer für Proteinelektrophorese)

Für den zweifach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 100 mL aufgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt bzw. die entsprechende Menge zu den Proteinen gegeben.

25 mL 4-fach Tris/SDS Puffer pH 6,8 (Abschnitt 4.1.5.3)
20 mL Glycerin [20 %]
2 mL β-Mercaptoethanol [2 %]
4 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [140 mM, 4 %]
1 mg Bromphenolblau

4.1.5.6 10-fach Laufpuffer (für die SDS-Page Gelelektrophorese)

Für den zehnfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt.

30,2 g Tris Base [250 mM]
144,0 g Glycin [1,920 M]
10,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1 %]

4.1.5.7 10-fach Transferpuffer (für den Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran)

Für den zehnfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt und dabei 20 % Methanol zugeben.

30,2 g	Tris Base [250 mM]
144,0 g	Glycin [1,920 M]
2,0 g	SDS (Natriumlaurylsulfat) [7 mM, 0,2 %]

4.1.5.8 Lysepuffer

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 500 mL aufgefüllt. Direkt vor dem Gebrauch wurde noch pro 10 mL oder 50 mL ein Protease Inhibitor Complete Mini oder Complete Tab zugegeben.

15,0 mL	5 M Natriumchlorid (NaCl) [150,0 mM]
5,0 mL	Nonidet P40
2,5 g	Desoxycholat
5,0 mL	10 % SDS [3,5 mM, 0,1 %]
5,0 mL	500 mM EDTA [5,0 mM]
10,0 mL	1 M Tris HCl, pH: 8,3 [20,0 mM]

4.1.5.9 SOB-Medium

Für das Nährmedium wurden zunächst die folgenden Chemikalien außer auf MgCl₂ und MgSO₄ eingewogen, in 1 L dest. H₂O gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden die restlichen Chemikalien sterilfiltriert und zugegeben. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von 50 mL bei -20°C.

20,0 g	Trypton [2,0 %]
5,0 g	Hefe [0,5 %]
10,0 mL	1 M NaCl [10,0 mM]

2,5 mL 1 M KCl [2,5 mM]

10,0 mL 1 M MgCl₂ [10,0 mM]

10,0 mL 1 M MgSO₄ [10,0 mM]

4.1.5.10 SOC-Medium

Dem SOB-Medium (Abschnitt 4.1.5.9) wurde 20 mM Glukose zugefügt.

4.1.5.11 Stopplösung

Für die Stopplösung wurde Essigsäure auf 2 % mit dest. H₂O verdünnt.

4.1.5.12 Fixierer

Für den Fixierer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 2 L aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

625 g Natriumthiosulfat Pentahydrat (Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) [1,26 M]

49 g Kaliummetabisulfit (K₂S₂O₅) [0,11 M]

4.1.5.13 Transformationspuffer (für die Herstellung kompetenter Bakterien)

Für den Puffer wurden zunächst die folgenden Chemikalien eingewogen, dann in 1 L dest. H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von 50 mL bei -20°C.

10 mL 1 M Hepes [10 mM]

15 mL 1 M CaCl₂ [15 mM]

250 mL 1 M KCl [250 mM]

55 mL 1 M MnCl₂ [55 mM]

4.1.5.14 DAPI-Gebrauchslösung

Es wurde zunächst eine Stammlösung von 50 µg DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) pro 1 mL Methanol hergestellt. 1,0 mL Stammlösung wurde anschließend in 24,5 mL Methanol und 24,5 mL PBS gelöst. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert, die Gebrauchslösung bei 4°C. Diese wurde zur Verwendung nochmals 1:200 verdünnt.

4.1.5.15 2-fach HEPES-Ringer Lösung

Für den zweifach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 500 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt, dann der Puffer sterilfiltriert.

8,00 g	Natriumchlorid (NaCl) [273,0 mM]
0,38 g	Kaliumchlorid (KCl) [10,0 mM]
0,01 g	Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) [0,1 mM]
5,00 g	Hepes (C ₈ H ₁₇ N ₂ NaO ₄ S) [38,0 mM]
1,00 g	Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆) [11,0 mM]

4.1.5.16 LB-Medium

LB-Medium ist ein Nährmedium für Bakterien. Für das Medium wurden die folgenden Chemikalien eingewogen, mit dest. H₂O auf 1 L aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

10 g	Pepton [1,0 %]
5 g	Hefeextrakt [0,5 %]
10 g	NaCl [171 mM]

4.1.5.17 50-fach Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Tris-Acetat-EDTA-Puffer wird für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt, wobei er als Elektrolyt dient. Für den 50-fach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 1 L aufgefüllt.

242,0 g	Trisbase [2,000 M]
57,1 mL	konz. Essigsäure [1,000 M]
37,2 g	EDTA [127 mM]

4.1.5.18 Puffer B (Verdau von Mausgewebe)

Folgende Reagenzien wurden eingewogen, in 100 mL dest. H₂O gelöst und auf pH 8,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

2,5 mL	1 M EDTA [25 mM]
7,5 mL	1 M NaCl [75mM]

4.1.5.19 Isolierlösung

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 500 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und anschließend der Puffer sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

12,70 mL 5 M NaCl [127,0 mM]

1,18 mL 2,5 M KCl [5,9 mM]

0,60 mL 1 M MgCl₂ [1,2 mM]

5,00 mL 1 M Hepes [10,0 mM]

1,17 g Glukose [11,8 mM]

4.1.5.20 HBSS-Puffer (HBSS = Hank's balanced salt solution)

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien, bis auf Glukose, Calciumchlorid oder EGTA, eingewogen und mit dest. H₂O auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei RT. Vor der Verwendung wurde noch Glukose und je nach Anwendung 2,2 mM Calciumchlorid oder EGTA als Calciumionenchelator für eine Ca²⁺ freie extrazelluläre Lösung zugefügt.

28,0 mL 5 M NaCl [140 mM]

2,0 mL 2,5 M KCl [5 mM]

1,0 mL 1 M MgCl₂ [1 mM]

10,0 mL 1 M Hepes [10 mM]

4,5 mL 20 % Glukose [5 mM]

4.1.5.21 DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat, DEPC) dient der Inaktivierung von RNasen. Daher kann Wasser zur Aufbereitung von RNA mit Hilfe von DEPC RNase-frei gemacht werden. 1 mL DEPC wurde in 1 L dest. H₂O gelöst und über Nacht gerührt. Zur Inaktivierung des toxischen DEPC wurde die Lösung dann noch bei 120°C autoklaviert.

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Erstantikörper

gerichtet gegen	aus Spezies	Verdünnung	Sonstiges	Firma / Arbeitskreis
TRPC1	Maus	1:1000	monoklonal	Tsiokas
TRPC1	Ratte	1:2	Hybridomüberstand 9F2	Flockerzi
TRPC4	Hase	1:400	polyklonal 1056 affinitätsgereinigt, 1mg/mL	Flockerzi
TRPC6	Hase	1:5000		Flockerzi
TRPC6	Hase	1:400		Alomone (ACC-017)
Na ⁺ /K ⁺ - ATPase	Maus	1:2500	monoklonal	Sigma (A276)
HA	Ratte	1:1000	3F10 Peroxidase gekoppelt	Roche (12013819001)
HA	Ratte	1:1000	3F10	Roche (11867423001)
Podocin	Hase	10µg/mL		Sigma (P0372)

Tabelle 4.6: Verwendete Erstantikörper.

Die Erstantikörper wurden mit folgender Lösung verdünnt:

5,00 % BSA (Bovines Serum Albumin)

0,05 % Triton X100

0,05 % NaN₃

100 mL PBS

4.1.6.2 Zweitantikörper

gerichtet gegen	aus Spezies	Verdünnung	Sonstiges	Firma / Arbeitskreis
Maus	Ziege	1:10000		Sigma (A2554)
Hase	Ziege	1:1000	IgG whole molecule	Sigma (A6154)
Ratte	Hase	1:80000	IgG whole molecule	Sigma (A5795)
Hase	Ziege	1:160	FITC gekoppelt	Sigma (F0382)

Tabelle 4.7: Verwendete Zweitantikörper.

Die Zweitantikörper wurden mit PBST verdünnt.

4.1.6.3 Toxine

gerichtet gegen	aus Spezies	Verdünnung	Sonstiges	Firma / Arbeitskreis
F-Aktin	Amanita Phalloides	500 ng/mL	TRITC gekoppelt	Fluka, Sigma (77418)

Tabelle 4.8: Verwendete Toxine.

4.1.7 Plasmide

Die im Arbeitskreis vorliegenden Plasmide enthalten cDNAs, die in den pcDNA 3.1-Vektor von Invitrogen kloniert wurden (siehe Tabelle 4.9). Zur besseren Erkennung durch Antikörper wurden codierende Sequenzen immunogener Epitope (sog. “protein-tags”) mit den cDNAs fusioniert.

4 Material und Methoden

Plasmid	vorhandene Tags	Spezies	mRNA accession number
TRPC1		human	NM_003304
TRPC1	HA N-terminal, C-terminal und beides	murin	NM_011643
TRPC6	C-terminal HA, YFP	human	NM_004621
TRPC6	C-terminal GFP	murin	NM_013838
TRPC6 M132T	C-terminal YFP	human	NM_004621
TRPC6 N143S	C-terminal YFP	human	NM_004621
PLC ϵ		human	NM_016341 [10]
PLC ϵ H1144L		human	NM_016341 [10]

Tabelle 4.9: Verwendete Plasmide.

4.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden kommerziell bei Metabion synthetisiert.

4.1.8.1 Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung der Mäuse durch Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden jeweils Oligonukleotide für das mutierte Allel und Oligonukleotide für das Wildtyp-Allel verwendet. Wenn beide Oligopaare ein Produkt liefern, liegt ein heterozygoter Genotyp (+/-) vor.

Gen	sense / antisense (5'->3')
TRPC1 WT	GGCAACCTTTGCCCTCAAAGTGGTGGC / AGTGAATATATATATATCAGACATAGATTTGGG
TRPC1 -/-	TCTATGGCTTCTGAGGCGGA / GCATTATTAATATCTGAGT- CATTTTCTTATTGGCAAATGAGG
TRPC6 WT	CAGATCATCTCTGAAGGTCTTTATGC / CATCAGGACCCCGAGCACCACATAC
TRPC6 -/-	ACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC / GGGTTTAATGTCTGTATCACTAAAGCCTCC
PLC ϵ WT	GCGTATTTCCAGAGTTAGAACAAGG / CCACAACCAGGACCAGAGATG
PLC ϵ -/-	GCGTATTTCCAGAGTTAGAACAAGG / CTGCAAAGGGTCGCTACAGA

Tabelle 4.10: Oligonukleotide zur Genotypisierung.

4.1.8.2 Oligonukleotide für quantitative Reverse Transcriptase(RT)-PCR

Bei der Real-Time-PCR handelt es sich um eine quantitative RT-PCR. Mit dieser Methode kann der mRNA-Gehalt für verschiedene Proteine ermittelt werden (siehe auch Abschnitt 4.5.3).

Gen	sense / antisense (5'→3')	Produktlänge / bp	Position der Oligonukleotide	Bezeichnung
TRPC1	GCCCCACCTTTCAACATTA / GTGCGCATGGACGTCAGGTAG	209	2553 / 2742	TRPC1 [43] V3+R4
TRPC3	AGGCGCAGCAGTATGTGGA / GGCCAAAGCTCTCGTTTGC	207	1451 / 1639	TRPC3 [43]
TRPC4	CTCCGCCTGATCTCTCTGT / AAACGCGTTGTTCTGTTTCT	216	1654 / 1850	TRPC4 [43]
TRPC5	ATGAGGGGCTAACAGAAGA / TGCAGCCTACATTGAAAGA	210	2606 / 2797	TRPC5 [43]
TRPC6	CAAGCCTGTCTATTGAGGAA / CCCAACTCGAGACAAGTTT	209	565 / 755	TRPC6 [43]
TRPC7	CCTACGCCAGGGATAAGTG / AAGGCCACAAATACCATGA	205	1668 / 1854	TRPC7 [43]
TRPC1	GATGTGTCTTTGCCCAAGC / CTGGACTGGCCAGACATCTAT	127	1063 / 1174	TRPC1 [77] V1+R1
TRPC1	GCAACCTTTGCCCTCAAAG / CTGCAGTGGGCCCAAA- TAGAG	179	1921 / 2079	TRPC1 [77] V2+R2
TRPC1	GCAACCTTTGCCCTCAAAG / AACAGAGCAAAGCAGGTGC	380	1921 / 2285	TRPC1 [77] V2+R3
β Actin	CCAACCGTGAAAAGATGACC GTGGTACGACCAGAGGCATAC	106	420 / 505	β Actin

Tabelle 4.11: Oligonukleotide für die RT-PCR [43, 77].

4.1.8.3 Oligonukleotide für die Mutagenese

Bei der Mutagenese werden in vorhandene Plasmide Mutationen eingefügt. Hierbei werden jeweils zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die den Basenaustausch in ein Plasmid einführen [78]. In der Tabelle 4.12 sind die Oligonukleotide mit den entsprechenden Mutationen aufgeführt. Hierbei geben die Bezeichnungen die Ausgangsamino-

4 Material und Methoden

säure, den Ort der Mutation und die neue Aminosäure an.

Mutation	sense / antisense (5'→3')
hTRPC6 G109S	TTTTGGATGCAGCTGAATATTCTAACATCCCAGTGGTGC GGAA / TTCCGCACCACTGGGATGTTAGAATATTCAGCTG CATCCAAAA
hTRPC6 S270T	AGCATGACTCGTTTtagccacACCAGATCTAGGATTAAT GCCTA / TAGGCATTAATCCTAGATCTGGTGTGGCTAAA CGAGTCATGCT
hTRPC6 L780P	TGTTTTATCTCTTACTGAAGCCTAAAAAATGGATTTCTG AGCT / AGCTCAGAAATCCATTTTTTAggCTTCAGTAAGA GATAAAACA
hTRPC6 Q889K	GGGAActGAAGGAAATTAAGaAGGACATCTCAAGTCTC CGCTA / TAGCGGAGACTTGAGATGTCCTTCTTAATTTCC TTCAGTTCCC
hTRPC6 E897K	ACATCTCAAGTCTCCGCTATAAACTCCTTGAAGAAAAAT CTCA / TGAGATTTTTCTTCAAGGAGTTTATAGCGGAGAC TTGAGATGT

Tabelle 4.12: Oligonukleotide für die Mutagenese.

4.1.8.4 Oligonukleotide für die Klonierung

Bei der Klonierung des mTRPC1 wurden die in Tabelle 4.13 aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

4 Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz	Sense / Anti- sense	Position der Oligo- nukleotide
mTRPC1 START	ATGGGGGGCCCCGCCTCCGTCT CCTGGCCTGCCCCCGTCGT	sense	472-511
mTRPC1 reverse BstEII	GGTGGGCTTACGGCGGTAACC TGACATCTGTCCAAACCAAAC	anti- sense	1560-1519
mTRPC1 forward BstEII	GTTTGGTTTGGACAGATGTCA GGTTACCGCCGTAAGCCCACC	sense	1519-1560
mTRPC1 STOP	TTAATTTCTTGGATAAAACAT AGCATATTTAGAAGTCCGA	anti- sense	2901-2862
mTRPC1 472-HA-490	ATGTACCCTTACGACGTTCCCT GATTACGCTGGGGCCCCGCC TCCG	sense	472-490
mTRPC1 2901-HA-2883 revcom	TTAAGCGTAATCAGGAACGT CGTAAGGGTAATTTCTTGGA TAAAA	anti- sense	2901-2883
mTRPC1 2896-2876 revcom	TTCTTGGATAAAACATAGC	anti- sense	2896-2876

Tabelle 4.13: Oligonukleotide für die Klonierung, in blau ist das Hämagglutinin-Tag dargestellt.

4.1.9 Sonstige Hilfsmittel

Diese Arbeit wurde mit der Textverarbeitungssoftware Lyx und dem Literaturverwaltungsprogramm Jabref verfasst. Für die Auswertung der Daten und die Bearbeitung von Bildern wurden gerätespezifische Programme sowie ChemDraw, Photoshop, Fiji, Irfan-View, Powerpoint und Exel verwendet. Bei der Zucht und Genotypisierung der Mäuse haben die technischen Assistentinnen Petra Eigner und Christiana Oehlmann geholfen. Bei der Aufnahme der konfokalen Aufnahmen der Podozyten hat Dr. Hermann Kalwa mitgewirkt. Sequenzierungen wurden kommerziell bei der Seqlab AG, Göttingen durchgeführt.

4.2 Mäuse

4.2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in IVCs ("isolated ventilated cages") gehalten, hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser und unterlagen einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus. Die

gendefizienten Mäuse stammten aus eigener Zucht und wurden auf einem 129SV/C57bl6 genetischen Hintergrund gezüchtet.

4.2.2 Mauslinien

Es wurden folgende Mauslinien verwendet.

WT	129SV/C57bl6 genetische Hintergrund
TRPC1-/-	129SV/C57bl6 genetische Hintergrund [77]
TRPC6-/-	129SV/C57bl6 genetischer Hintergrund [79]
PLC ϵ -/-	129S6/C57bl6 genetischer Hintergrund [80]
TRPC6-/-PLC ϵ -/-	wurden durch Kreuzung der beiden Genotypen erhalten

4.2.3 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung mittels PCR der Mäuse aus der eigenen Zucht erfolgte mit DNA, welche aus einem Stück Gewebe von der Schwanzspitze der Maus gewonnen wurde (nach [81]).

Bei 3 Wochen alten Mäusen wurden die letzten 3 mm der Schwanzspitze abgetrennt und diese Gewebeprobe in 300 μ L Puffer B mit 30 μ L 10 % SDS und 0,3 mg Proteinase K über Nacht bei 55°C verdaut. Am nächsten Tag wurde 1,5 μ L RNase A (5 mg/mL) zugegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt, um RNA zu entfernen. Es wurden 100 μ L gesättigte NaCl zugegeben, 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert und 30 min bei 13.000 rpm die nun gefällten Proteine abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die DNA wurde durch Zugabe von 800 μ L 100 % EtOH 5 min auf dem Schüttler gefällt, anschließend 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μ L 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 80 μ L dest. H₂O resuspendiert.

Puffer B

Folgende Reagenzien wurden eingewogen, in 100 mL dest. H₂O gelöst und auf pH 8,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

2,5 mL 1 M EDTA [25 mM]

7,5 mL 1 M NaCl [75mM]

4 Material und Methoden

Die aufgereinigte DNA wurde anschließend über eine PCR untersucht. Dazu waren für gendefiziente und für Wildtyp-DNA jeweils “Sense” und “Antisense” Oligonukleotide notwendig, so dass mit jeder DNA zwei PCR-Reaktionen durchgeführt wurden. Die folgenden Reagenzien wurden auf Eis in ein 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler durchgeführt.

19,8 µL	H ₂ O
2,5 µL	PCR-Puffer
0,5 µL	dNTPs
0,5 µL	Oligonukleotid 1
0,5 µL	Oligonukleotid 2
0,2 µL	Taq Polymerase
1,0 µL	DNA

Das Temperaturprofil der PCR wurde wie folgt gewählt:

94°C	5 min
Start Zyklus, 40 mal wiederholt	
94°C	30 s
55°C	30 s
72°C	60 s
Ende Zyklus	
72°C	5 min

4.2.4 Präparation von Organen

Zur Präparation wurde das Tier zunächst durch eine Überdosis Isofluran oder mittels Genickbruch getötet, fixiert und mit 70 % EtOH desinfiziert. Anschließend wurde das Fell vom Unterbauch an aufgeschnitten, fixiert, der Bauch eröffnet und der Brustkorb aufgeschnitten. Bei der Präparation der Podozyten wurde zunächst das Fell am Rücken entfernt und die Nieren über Schnitte rechts und links der Wirbelsäule zugänglich gemacht. Die freiliegenden Organe wurden mit der Pinzette gegriffen und mit einer Schere abgetrennt. Je nach Verwendungszweck der Organe wurden diese dann in Isolierlösung (Abschnitt 4.1.5.19) oder das entsprechende Zellkulturmedium gegeben und weiter bearbeitet.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Isolation

4.3.1.1 Isolation von embryonalen Fibroblasten

Eine trächtige Maus wurde am 14. Schwangerschaftstag durch Genickbruch getötet, fixiert, mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Bauchraum eröffnet. Der deutlich sichtbare Uterus mit bis zu 10 Embryonen wurde herausgetrennt und in Isolierlösung (Abschnitt 4.1.5.19) gegeben. Die Embryonen waren hier als kugelförmige Verdickungen zu erkennen. Diese wurden aufgeschnitten und die Hülle um den Embryo mit Pinzetten geöffnet. Mit einer Schere wurde der zu diesem Zeitpunkt teilweise schon knöcherne Schädel und auch die Leber entfernt. Der Rest wurde in 10 mL des entsprechenden Mediums (Tabelle 4.14) auf eine 100 mm Petrischale gegeben und durch mehrmalige Spritzenpassage mit einer Kanüle mit dem Durchmesser 21 "gauge" homogenisiert. Die Zellen wurden in den CO₂-Inkubator gestellt und bereits nach 24 h konnten Gewebereste durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt werden.

4.3.1.2 Isolation von Podozyten

Die Podozytenisolierung wurde nach einer bereits publizierten Methode durchgeführt [82]. Es wurden acht 10 Tage alte Mausjunge desselben Genotyps durch eine Überdosis an Isofluran getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Über einen Schnitt im Rücken wurde das Fell zum Kopf und den Hinterläufen gezogen und dann das Tier bäuchlings fixiert. Durch Schnitte rechts und links der Wirbelsäule wurden die Nieren herauspräpariert und in eine 50 mL Zentrifugenröhre mit 37°C warmen Isolationsmedium gegeben. Unter der Zellkultur Werkbank wurden die Nieren mit dem Isolationsmedium nun in das oberste und größte Sieb eines aufgestellten Siebturms mit den Maschengrößen 100 µm, 75 µm, 50 µm und 36 µm geschüttet. Zuvor wurden alle Siebe mit Beschichtungsmedium getränkt. Mit dem Stempel einer 20 mL Spritze wurden die Nieren auf dem Sieb homogenisiert. Das oberste Sieb wurde mit 100 mL Isolationsmedium gespült und die auf dem Sieb verbliebenen Gewebereste verworfen. Anschließend wurde das zweite und dritte Sieb ebenfalls mit 100 mL Isolationsmedium gespült. Das unterste Sieb wurde nun kopfüber in eine 150 mm Petrischale gestellt und die darauf liegenden Zellen wiederum mit 100 mL Isolationsmedium in die Schale überführt. Die Zellsuspension wurde in 50 mL Zentrifugenröhren überführt und 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Das überstehende Medium wurde entfernt, die beiden Zellsedimente in insgesamt 15 mL Podozytenmedium (Tabelle 4.14) aufgenommen und in eine 75 cm² Gewebekulturflasche zur Kultivierung

gegeben. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 2 Tagen, Zellen waren in der Regel erst nach 4 Tagen deutlich zu erkennen.

Isolationsmedium

Ham's F12 mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Beschichtungsmedium

1:1 Isolationsmedium : FCS

4.3.2 Kultivierung der Zellen

Alle Zelltypen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. HEK293-Zellen und Fibroblasten wurden alle drei Tage 1:4 gesplittet, Podozyten nur bei Bedarf. Dazu wurden sie zunächst mit 5,0 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5 mL Trypsin zugegeben, 3 min inkubiert und die Trypsinaktivität mit 7,5 mL Medium, welches 10 % FCS enthielt, abgestoppt. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren abgelöst, bei 1.200 rpm abzentrifugiert und in 10 mL Medium (Tabelle 4.14) aufgenommen.

4.3.3 Zelllinien und Nährmedien

Die Medien in der Zellkultur wurden von PAA (Cölbe) bezogen; FCS, Trypsin, Penicillin/Streptomycin und PBS von Invitrogen und andere Zusätze von Sigma-Aldrich. Normocin wird von Invivogen hergestellt.

Zelllinie	Herkunft	Nährmedium
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM High Glucose, 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Podozyten	Primäre murine Zellen aus der Niere	Ham's F12 mit stabilem Glutamin, 10 % FCS, 100 µg/mL Normocin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/mL Transferrin, 5 ng/mL Natriumselenite, 5 µg/mL Insulin, 100 nM Hydrocortison
MEF	Primäre murine embryonale Fibroblasten	DMEM High Glucose, 10 % FCS, 100 µg/mL Normocin

Tabelle 4.14: Zelllinien und Nährmedien

4.3.4 Transfektionen

Es gibt diverse Möglichkeiten, um Plasmide in Zellen einzuführen. Welche Methode angewendet wird, hängt sowohl vom Zelltyp als auch von der Verwendung der transfizierten Zelle ab. HEK293-Zellen sind leicht z. B. mit der lipophilen Polymerlösung TransIT-LT1 zu transfizieren. Primäre Podozyten dagegen sind äußerst schwer zu transfizieren. Deshalb wurden hier diverse Methoden ausgetestet. Vor allem Elektroporation ist eine sehr effektive Methode, bei der durch elektrische Pulse kleine Löcher in der Zellwand entstehen, durch die dann das Plasmid gelangen kann. Allerdings werden bei dieser Methode die Zellen so stark beschädigt, dass bis zu 50 % absterben. Eine weitere Methode um DNA in Zellen einzubringen, ist die Infektion mit Lentiviren.

Transfektion mit TransIT-LT1

In einer 6-Loch Platte wurden je 100.000 HEK293-Zellen in 2,5 mL Medium (Tabelle 4.14) pro Loch ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 250 µL Earls MEM Zellkulturmedium, serumfrei, vorgelegt, es wurden 1,5 µg Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und 5 min inkubiert. Dann wurden 4,5 µL TransIT-LT1 Transfektionsreagens (3 µL TransIT-LT1 pro µg DNA) zugegeben und 20 min inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz unter Schwenken auf die Zellen gegeben und 24 h inkubiert.

Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Es wurden zwei Reaktionsgefäße mit je 250 µL Optimem Medium vorbereitet. In das Erste wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, in das Zweite 2,5 µL Lipofectamine. Nach 5 min Inkubation wurden beide Ansätze vereint und nach weiteren 20 min bei RT unter Schwenken auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Medienwechsel.

Transfektion mit Lonza-Elektroporation

Der Nucleofector von Lonza ist ein Gerät zur Elektroporation. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Zellen zu elektroporieren. Der Nucleofector arbeitet mit einer Reaktionsküvette und zellspezifischen Spezialpuffern.

Es wurden 1.000.000 trypsinierte Zellen in 100 µL der Speziallösung für Epithelzellen mit 3 µg Plasmid DNA vereint und in eine Küvette gegeben. Diese wurde dann in den Nucleofector gestellt und das Programm T-020 gewählt. Anschließend wurden die Zellen in dem entsprechenden Vollmedium (Tabelle 4.14) aufgenommen und auf eine 30 mm Zellschale gegeben.

Transfektion mit NEON-Elektroporation

Das NEON Gerät von Invitrogen arbeitet auch mit Elektroporation, jedoch erfolgt die Reaktion hier in einer Art Pipettenspitze. Dadurch soll die Transfektion bei geringerer Zelltoxizität effizienter sein.

Es wurden 50.000 trypsinierte Zellen in 10 μ L Spezialpuffer aufgenommen und 0,5 μ g Plasmid DNA zugefügt. Die Lösung wurde mit der Spezialpipette aufgenommen und in das Gerät gestellt. Hier wurde nun Spannung, Pulslänge und Pulsanzahl eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in ein Loch einer 24-Loch-Platte in 0,5 mL antibiotikafreies Vollmedium (Tabelle 4.14) gegeben.

Transfektion mit Lentiviren

Primäre Zellen wurden 50 % konfluent auf eine 35 mm Petrischale in 2 mL Medium ausgesät. In einem S2-Labor wurde 1 mL Medium entfernt und durch 1 mL serumfreies Medium ersetzt, in welchem 2 μ L Polybren und 5 μ L G5A-Viren enthalten waren. Die MOI (multiplicity of infection) beträgt bei beiden Viren 1×10^7 infektiöse Partikel pro Milliliter. Polybren (1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen polymethobromid) ist ein Polymer, welches die Virusaufnahme erleichtert. Nach 8 h erfolgte ein Medienwechsel.

4.3.5 Kryokonservierung von kultivierten Zellen

Zellen können über mehrere Jahre konserviert werden, wenn sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für den Einfrierprozess muss hierbei Dimethylsulfoxid (DMSO) als eine Art Frostschutzmittel zugefügt werden, damit die Zellen durch Bildung von Eiskristallen nicht platzen.

Eine zu 50 % konfluente 100 mm Zellkulturschale mit Zellen wurde mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2,5 mL Trypsin abgelöst. Die Trypsinisierung wurde mit 7,5 mL Medium (Abschnitt 4.14) abgestoppt. Die Zellen wurden in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und bei 1.200 rpm 5 min abzentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit Medium im halben Endvolumen aufgenommen, zu dem daraufhin das gleiche Volumen Einfriermedium (Medium mit 20 % DMSO) pipettiert wurde. Die Suspension wurde in ein Einfrierrohrchen gegeben. Das Gefäß wurde in einen auf 37°C vorgewärmten Einfriertank mit Isopropanol gestellt, bei -80°C eingefroren und nach einem Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden mit Plasmiden transfizierte HEK293-Zellen einer 6-Lochplatte verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit 1 mL PBS gewaschen und mit 150 μ L eisgekühltem PBS mit Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Tab von Roche) (1 Tab pro 50 mL PBS) versetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen dann abgelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Zelllysate wurde das gleiche Volumen Laemmli-Puffer gegeben. Genomische DNA wurde mit einem Ultraschallstab zerstört. Zur Denaturierung (Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins) wurden die Proben 10 min bei 90°C erhitzt.

2-fach Laemmli (Ladepuffer für Proteinelektrophorese)

Für den zweifach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 100 mL aufgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt bzw. die entsprechende Menge zu den Proteinen gegeben.

25 mL	4-fach Tris/SDS Puffer pH 6,8 (Abschnitt 4.1.5.3)
20 mL	Glycerin [20 %]
2 mL	β -Mercaptoethanol [2 %]
4 g	SDS (Natriumlaurylsulfat) [140 mM, 4 %]
1 mg	Bromphenolblau

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen kann mithilfe des Bradford-Assays bestimmt werden. Der Farbstoff Serva Blue G bildet mit Proteinen einen stabilen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Die Menge des gebildeten Komplexes kann photometrisch gegen einen Standard bestimmt werden, der Anstieg der Absorption ist dabei linear zur Proteinmenge. Dieser Assay eignet sich für die Proteingehaltsbestimmung in Zelllysaten oder ähnlichem, natürlich in farblosem Puffer. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet, der Leerwert wurde bei dem Gerät als Blank eingestellt, über den Standard erfolgte die Berechnung der Probenkonzentration mittels Dreisatz.

4 Material und Methoden

1. Leerwert: 98 μ L Wasser + 2 μ L Lysatpuffer (1 x)
2. Standard: 98 μ L Wasser + 2 μ L BSA (2 mg/mL) (3 x)
3. Probe: 98 μ L Wasser + 2 μ L Probe (3 x)

Zu diesen Proben wurden dann jeweils 1,5 mL Bradfordlösung gegeben, geschüttelt und nach 5 min vermessen.

Bradfordlösung

2,5 mg Serva Blue G wurden in 2,5 mL Ethanol gelöst, 5 mL Ortho-Phosphorsäure zugegeben und mit Wasser auf 50 mL aufgefüllt.

4.4.3 Oberflächenbiotinylierung

Durch eine Oberflächenbiotinylierung kann überprüft werden, welche Proteine an der Oberfläche der Zelle lokalisiert sind. Wenn zu intakten Zellen der N-Hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-NHS) des Biotins gegeben wird, koppeln diese Moleküle an die Aminogruppen von Proteinen, die in der Zellmembran liegen. Nach Lysieren der Zelle werden die Biotingruppen an Neutravidin gebunden, das kovalent an zentrifugierbare Agarosekugeln gekoppelt ist. Durch Zentrifugation der Agarosekugeln gelingt somit die spezifische Isolation von Proteinen, die in der äußeren Zellmembran der Zelle lokalisiert sind (siehe Abbildung 4.1 und 4.2).

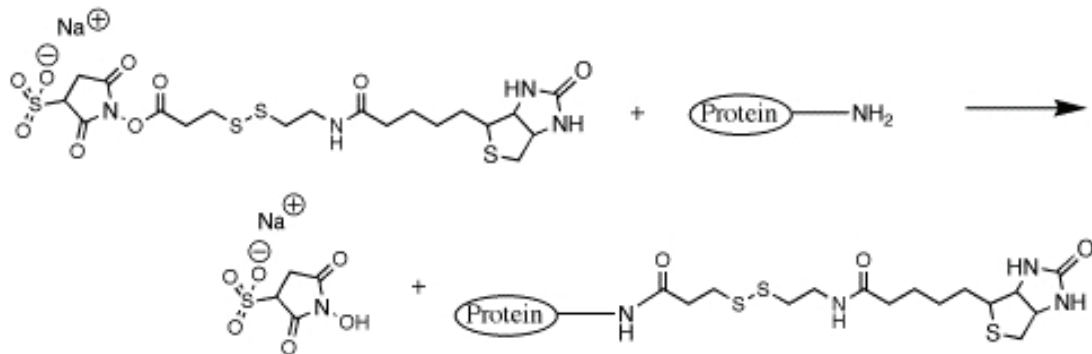


Abbildung 4.1: Reaktion der Oberflächenbiotinylierung.

Es wurden 1.000.000 Zellen auf eine 100 mm Zellkulturschale ausgesät, die zuvor mit Poly-Lysin beschichtet worden war. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS-CM (siehe unten) gewaschen. Dann wurde 1 mL EZ-Link Sulfo NHS Biotin

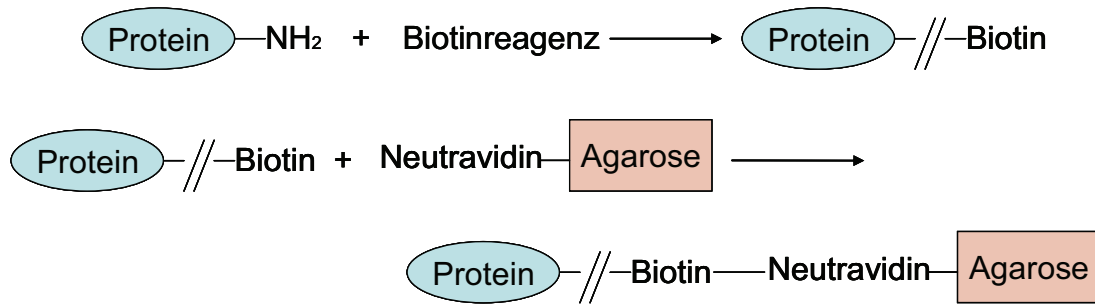


Abbildung 4.2: Methode der Oberflächenbiotinylierung.

(1,5 mg/mL in PBS) auf die Zellen gegeben und diese eine Stunde bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Das Reagenz wurde entfernt, die Zellen zweimal mit 10 mL PBS-BSA (siehe unten) und zweimal mit 10 mL PBS-CM gewaschen, um Überreste des Reagenz zu inaktivieren. Es wurde 1 mL RIPA-Puffer (siehe unten) zugegeben und 1 h bei 4°C geschüttelt. Die Zellen wurden homogenisiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 150 µL Neutravidin-Agarose zugegeben und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Probe wurde 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und das Pellet fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen. Da die Probe anschließend mittels SDS-Page weiter bearbeitet werden sollte, wurden die sedimentierten Proteine in 60 µL Laemmli-Puffer resuspendiert und 10 min auf 90°C erhitzt.

PBS-CM (Phosphate Buffered Saline mit Calcium und Magnesium)

PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurde mit 1 mM MgCl₂ und 0,5 mM CaCl₂ versetzt.

PBS-BSA (Phosphate Buffered Saline mit Bovine serum albumine)

PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurde mit 0,1 % BSA versetzt.

RIPA-Puffer (RIPA = Radioimmunoprecipitation assay)

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 200 mL aufgefüllt. Direkt vor dem Gebrauch wurde noch pro 10 mL ein Protease Inhibitor Complete Tab Mini zugegeben.

20 mL	500 mM Tris HCl, pH 7,5 [50 mM]
40 mL	1 M NaCl [200 mM]
2 mL	Triton x-100 [1 %]
0,5 g	DOC (Desoxicholat) [0,25 %]

20 mL 10 mM EDTA [1 mM]

20 mL 10 mM EGTA [1 mM]

4.4.4 Koimmunpräzipitation

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Zellen wurde eine sog. Koimmunpräzipitation durchgeführt. Hierbei werden Zellen zunächst lysiert, um dann ein Protein mit Hilfe eines Erstantikörpers zu isolieren. An den Fc-Teil dieses Antikörpers binden nun zentrifugierbare Protein A-Sepharose-Kügelchen. Durch die Zentrifugation der Sepharosekügelchen wird unter nicht-denaturierenden Bedingungen nicht nur das vom Antikörper erkannte Protein, sondern auch seine Interaktionspartner sedimentiert. Dieses Präzipitat wird dann mittels “Western Blot” analysiert.

Es wurde eine 100 mm Zellkulturschale mit Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 2 mL Lysepuffer zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 4°C und 14.000 x g abzentrifugiert, um übrige Zellwandbestandteile zu entfernen. In einem frischen Reaktionsgefäß wurden zum Überstand 1 µL Antikörper zugegeben und 2 h inkubiert. Anschließend wurden 30 µL Protein A-Sepharose zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 3 min lang bei 4°C und bei 5.500 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Proteine wurden dreimal in 1 mL Lysepuffer gewaschen, in 40 µL Laemmli-puffer (Abschnitt 4.1.5.5) resuspendiert, 10 min auf 90°C erhitzt und im “Western Blot” weiter analysiert.

Lysepuffer

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 500 mL aufgefüllt. Direkt vor dem Gebrauch wurde noch pro 50 mL ein Protease Inhibitor Complete Tab zugegeben.

15,0 mL 5 M Natriumchlorid (NaCl) [150,0 mM]

5,0 mL Nonidet P40

2,5 g DOC (Desoxicholat) [0,5 %]

5,0 mL 10 % SDS [3,5 mM, 0,1 %]

5,0 mL 500 mM EDTA [5,0 mM]

10,0 mL 1 M Tris HCl, pH: 8,3 [20,0 mM]

4.4.5 SDS-Page (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

“Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis” ist eine Methode, bei welcher Proteine mittels Elektrophorese auf einem Gel aus Acrylamid der Größe nach aufgetrennt werden. Das SDS überdeckt hierbei die Eigenladung der Proteine. Somit sind diese gleichmäßig negativ geladen und wandern zum Pluspol der Elektrophorese. Kleine Proteine können schneller das Polymernetz durchlaufen und sind somit weiter unten im Gel zu finden als große Moleküle.

Die Elektrophoresekammer (Firma Hoefer) wurde nach Anleitung zusammengesetzt. Es wurden pro Kammer 10 mL Trenngelmischung mit 90 μ L 10 % APS (Ammoniumpersulfat) und 45 μ L TEMED (Tetramethylethyldiamin) versetzt und zwischen die Glasplatten bis 1,5 cm unter den Rand gegossen. Das Trenngel wurde vorsichtig mit 1 mL Isopropanol überschichtet und eine Stunde inkubiert. Das Isopropanol wurde entfernt. Nun wurde pro Kammer 5 mL Sammelgelmischung mit 45 μ L 10 % APS und 22,5 μ L TEMED versetzt und diese über das Trenngel geschichtet, es wurde ein Probenkamm in das Sammelgel geschoben und dieses zwei Stunden aushärten gelassen. Anschließend wurde die Gelkammer in den Puffertank gestellt, diese mit einem Liter Laufpuffer befüllt und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Von den Proteinproben wurden jeweils 20 μ L in eine der entstandenen Taschen mittels einer Hamilton Spritze eingebracht. Der Tank wurde an eine Stromquelle mit 13 mA Stromstärke pro Kammer angeschlossen. Nach etwa zwei Stunden waren die Proben aufgetrennt. Das Gel konnte nun weiter bearbeitet werden.

Trenngelmischung (10 %)

20 mL	Acrylamid (30 %)
15 mL	Trispuffer pH 8,8 (Abschnitt 4.1.5.4)
25 mL	dest. H ₂ O

Sammelgelmischung

20 mL	Acrylamid (30 %)
25 mL	Trispuffer pH 6,8 (Abschnitt 4.1.5.3)
55 mL	dest. H ₂ O

10-fach Laufpuffer

Für den zehnfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt.

30,2 g	Tris Base [250 mM]
144,0 g	Glycin [1,920 M]
10,0 g	SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1 %]

4.4.6 Elektrotransfer von Proteinen auf eine Membran

Nach einer “SDS-Page” können die Proteine von dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran oder eine PVDF-Membran übertragen werden. Auf diesen haften Proteine sehr gut und können dort mit Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden. Dazu muss wiederum ein elektrisches Feld angelegt werden, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung des Pluspols und damit auf die Membran wandern.

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen aus der “SDS-Page” wurde auf eine mit Transferpuffer befeuchtete Membran gelegt, bei einer PVDF-Membran wurde diese zuvor kurz in Methanol aktiviert, dann wurde auf jede Seite ein Whatman Papier und ein Schwämmchen aufgelegt. Das ganze wurde in die “Wet-Blot” Kammer (Firma Bio-rad) nach Anleitung eingebaut und der Tank mit einem Liter Transferpuffer befüllt. Der Tank wurde an einen Power Supply angeschlossen und mit 13 mA pro Blot über Nacht inkubiert.

10-fach Transferpuffer

Für den zehnfach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde er dann entsprechend verdünnt und dabei 20 % Methanol zugegeben.

30,2 g	Tris Base [250 mM]
144,0 g	Glycin [1,920 M]
2,0 g	SDS (Natriumlaurylsulfat) [7 mM, 0,2 %]

4.4.7 "Western Blot"

Bei der "Western Blot" Methode werden die Proteine, welche vorher durch eine "SDS-Page" aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert wurden, durch spezifische Antikörper erkannt. Hierzu werden Antikörper benötigt, welche möglichst spezifisch an bestimmte Proteine binden, sogenannte Erstantikörper. An diese wiederum binden Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper, welche gegen den Erstantikörper gerichtet sind. Die gekoppelte Peroxidase sorgt für die Auslösung einer Chemolumineszenzreaktion, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Die mit Proteinen beladene Membran wurde eine Stunde in 10 % Roti-Block (Firma Roth) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden 10 mL Erstantikörperlösung (Abschnitt 4.1.6.1) in der entsprechenden Verdünnung auf die Membran gegeben und zwei Stunden inkubiert. Die Lösung kann bei 4°C aufbewahrt und wiederverwendet werden. Die Membran wurde erst dreimal 10 s, dann drei mal 10 min mit PBST (Abschnitt 4.1.5.2) gewaschen, dann wurden 10 mL Zweitantikörperlösung (Abschnitt 4.1.6.2) auf die Membran gegeben und zwei Stunden inkubiert. Die Membran wurde wie zuvor gewaschen, anschließend einmal 10 min mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) um das TWEEN zu entfernen. Die Membran wurde mit 500 µL SuperSignal Pico/Femto Substrate (Firma Thermo Scientific) benetzt, mit einer Klarsichtfolie bedeckt und ein Röntgenfilm aufgelegt, der 10 s bis mehrere Stunden belichtet wurde. Der Film wurde in 20 % Entwicklerlösung (Firma TETENAL AG) entwickelt, anschließend gestoppt und fixiert. Auf dem Film sind nun an den Stellen Banden sichtbar, an denen der Erstantikörper das Protein auf der Membran erkannt hat. Alternativ zu dem Röntgenfilm wurde eine digitale Aufnahme mit dem Chemismart gemacht.

Stopplösung

Für die Stopplösung wurde Essigsäure auf 2 % mit dest. H₂O verdünnt.

Fixierer

Für den Fixierer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H₂O auf 2 L aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

625 g Natriumthiosulfat Pentahydrat (Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) [1,26 M]

49 g Kaliummetabisulfit (K₂S₂O₅) [0,11 M]

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 RNA Isolierung aus Zellen

Bei der Isolierung von RNA muss verhindert werden, dass diese von RNasen zerstört wird. Da RNasen fast überall anzutreffen sind, wurde hierbei ausschließlich mit Handschuhen und mit Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen aus frisch geöffneten Beuteln gearbeitet. Die Isolierung erfolgte aus Mauszellen entweder mit Trifast oder mit einem Kit von Invitex. Trifast besteht aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. So können sowohl Zellen lysiert als auch RNasen und andere Enzyme inaktiviert werden. Durch Mischen mit Chloroform und anschließende Zentrifugation bilden sich drei Phasen, eine wässrige, in welcher die RNA enthalten ist, eine Interphase mit der DNA und eine organische Phase mit den Proteinen. In der wässrigen Phase kann die RNA dann mit Isopropanol gefällt werden. Das Invitex-Kit besteht aus mehreren Säulen, wobei zunächst die DNA abgetrennt, anschließend die RNA gebunden, mehrfach gewaschen und zum Schluss eluiert wurde.

Aufreinigung mit Trifast

Es wurde eine 100 mm Zellkulturschale mit konfluenten Zellen einmal mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) gewaschen, 1 mL Trifast zugegeben, 1 min inkubiert, die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min bei RT wurden 200 µL Chloroform zugefügt, geschüttelt und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zu der oberen, wässrigen Phase wurden in einem frischen Reaktionsgefäß 500 µL Isopropanol gegeben, 10 min bei RT inkubiert, 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die sedimentierte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 50 µL DEPC-Wasser aufgenommen, 15 min auf 65°C erhitzt und bei -20°C aufbewahrt.

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat, DEPC) dient der Inaktivierung von RNasen. Daher kann Wasser zur Aufbereitung von RNA mit Hilfe von DEPC RNase-frei gemacht werden. 1 mL DEPC wurde in 1 L dest. H₂O gelöst und über Nacht gerührt. Zur Inaktivierung des toxischen DEPC wurde die Lösung dann noch bei 120°C autoklaviert.

4.5.2 Erststrangsynthese

Um die Expressionsrate der mRNA in Zellen festzustellen, muss die zuvor isolierte RNA in "complementary DNA" (cDNA) umgeschrieben werden. Dies geschieht mittels PCR

(Polymerase Chain Reaction) mit dem Enzym “reverse Transkriptase” und einem Oligonukleotidgemisch (Random Hexamer Primer) mit sechs zufällig angeordneten Basen, mit dem fast überall eine Bindung an die RNA möglich ist. “Reverse transkriptase” ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase, welche vom gebundenen Oligonukleotid ausgehend die RNA durch Anfügen von Nucleotiden, den dNTPs, in cDNA kopiert.

Hier wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet. Es wurden 11 μL RNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 1 μL Random Hexamer Primer in der PCR-Maschine 5 min lang auf 65°C erhitzt. Auf Eis wurden dann 4 μL Reaktionspuffer (5x), 2 μL dNTP (10 mM), 1 μL RNase Inhibitor und 1 μL Reverse Transkriptase zugegeben und die reverse Transkription (RT) gestartet (5 min 25°C, 60 min 42°C, 10 min 70°C). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

4.5.3 Quantitative RT(Reverse-Transcriptase)-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen RT-PCR [83, 84] und bietet zusätzlich die Möglichkeit einer indirekten RNA-Quantifizierung [85]. Sie ermöglicht eine Aussage über die relative Expressionsstärke eines beliebigen Gens im Bezug auf ein stabil exprimiertes Gen, ein sog. “house keeping gene”, in diesem Fall β Aktin. Ein Zyklus einer PCR-Reaktion besteht aus drei Phasen:

1. Denaturierung: bei 94°C schmelzen die Doppelstränge auf, die DNA liegt einzelsträngig vor
2. Anlagerung der Oligonukleotide: bei 55°C lagern sich die Oligonukleotide an komplementäre Sequenzen des Vorlagestrangs an
3. Elongation: bei 72°C synthetisiert die Taq-Polymerase vom Oligonukleotid als Starter ausgehend einen neuen DNA-Einzelstrang komplementär zum Vorlagestrang, so dass am Ende wieder doppelsträngige DNA vorliegt.

Die Menge der vorhandenen DNA nach jedem Zyklus kann ermittelt werden, indem man am Ende der Elongation die Fluoreszenz des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR-Green bei 530 nm bestimmt, der durch Licht einer Wellenlänge von 494 nm angeregt wird. SYBR-Green lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein und kann nur in dieser Konformation fluoreszieren. Wenn die Menge des Produkts einen gewissen, zuvor definierten, Schwellenwert überschritten hat, wird dieser Zyklus als CT-Wert (Threshold Cycle = “Schwellenwert-Zyklus”) bezeichnet. Hier ist so viel Produkt vorhanden, dass die Fluoreszenz deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Im Idealfall wird die Menge

4 Material und Methoden

an DNA bei jedem Zyklus verdoppelt; es ist möglich, die DNA-Menge in Bezug auf ein stabil exprimiertes Haushaltsgen zu berechnen (Gleichung 4.1 und 4.2).

Die folgenden Reagenzien wurden auf einer speziellen 96-Loch-Platte vereint, diese dann verschlossen, 3 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit auf dem Boden des Gefäßes ist und schließlich die Platte in den Light Cycler gestellt.

5 µL	ABsolute SYBR Green qPCR Master Mix (2X)
2 µL	cDNA aus Erststrangsynthese 1:10 verdünnt
1 µL	RNA- und DNA-freies Wasser
1 µL	Oligonukleotid "sense" 10 pmol/µL
1 µL	Oligonukleotid "antisense" 10 pmol/µL

Bei jeder Messreihe wurde jede cDNA zusätzlich einmal mit β Aktin-Oligonukleotid zur Quantifizierung und jedes Oligonukleotid einmal mit Wasser anstelle der cDNA als Negativkontrolle gemessen.

Es wurden 45 Zyklen gemessen und die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet. Dazu wurden die folgenden Rechenoperationen durchgeführt:

$$CT(\beta ActinOligo) - CT(Oligo1) = \text{delta } CT \quad (4.1)$$

$$2^{\text{delta } CT} * 100 = X \quad (4.2)$$

X entspricht der relativen Expressionsrate in Prozent der Expression des "house keeping gene" β Actin.

Anschließend wurden die Proben noch zusätzlich auf ein Agarosegel aufgetragen. Auch dort konnte man erkennen, in welchen Proben DNA in größerer Menge entstanden war.

4.5.4 Ligation

Mit Hilfe einer Ligation kann ein Fragment in ein Plasmid kloniert werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation ist, dass die Vektor- und Fragmentenden kompatibel sind, also mit Restriktionsenzymen mit ähnlichen Erkennungsstellen geschnitten wurden.

Es wurden folgende Reagenzien zusammengegeben und 15 h bei 16°C inkubiert.

0,5 µL	20 mM ATP [1 mM]
--------	------------------

1 μ L	Ligase Puffer
1 μ L	T4 DNA Ligase
2 μ L	Vektor DNA
5,5 μ L	Insert DNA

Als Kontrollreaktion wurde anstelle der Fragment-DNA Wasser verwendet oder auch die Ligase weggelassen. Anschließend wurde die Ligation in kompetente Bakterien transformiert, vermehrt (Abschnitte 4.5.8, 4.5.9) und die entstandenen Plasmide untersucht.

4.5.5 Mutagenese

Mit einer Mutagenese ist es möglich, eine Mutation in ein vorhandenes Plasmid einzuführen. Es werden DNA-Basen ausgetauscht, damit während der Proteintranslation entsprechend andere Aminosäuren eingebaut werden können. Hierzu müssen Oligonukleotide erstellt werden, welche in der Mitte die Mutation enthalten und rechts und links davon jeweils 20 Basen der Ausgangssequenz, diese jeweils als Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotid. Zunächst wird dann eine PCR gemacht, anschließend in einem Restriktionsverdau das Ausgangsplasmid mit dem Enzym DpnI zerstört, das nur an Erkennungsstellen mit methylierten Basen, wie sie durch Amplifikation in Bakterien entstehen, spaltet [78]. Die DNA wird nun in Bakterien transformiert und auf einer Agarplatte vermehrt. Aus den Bakterien kann dann das mutierte Plasmid geerntet werden.

Eine PCR wurde mit folgenden Bestandteilen angesetzt, der Puffer und die Polymerase sind von Finnzymes, die Oligonukleotide für die Mutation des TRPC6-Plasmides sind in Abschnitt 4.1.8.3 aufgeführt.

10 μ L	HF Puffer
5 μ L	Ausgangsplasmid (1 ng/ μ L)
1 μ L	Vorwärtsoligonukleotid (10 pmol/ μ L)
1 μ L	Rückwärtsoligonukleotid(10 pmol/ μ L)
1 μ L	dNTPs
31 μ L	H ₂ O
1 μ L	Phusion Polymerase

Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt:

95°C 30 s

Start Zyklus, 12 Wiederholungen

95°C 30 s

55°C 1 min

68°C 1 min pro kb Plasmid

Ende Zyklus

4°C 5 min

Zu der so erhaltenen DNA wurde nun 1 μ L des Restriktionsenzym DpnI zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 37°C verdaut. Anschließend wurde eine Transformation in kompetente Bakterien (Abschnitt 4.5.8) vorgenommen und die gewünschte DNA isoliert (Abschnitt 4.5.9).

4.5.6 Herstellung von Agarplatten

Es wurden 7,5 g Agar mit LB-Medium (Abschnitt 4.1.5.16) auf 500 mL aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf unter 60°C wurden 50 mg Ampicillin [100 μ g/mL] zugegeben und der Agar auf 100 mm Petrischalen aufgeteilt (10 mL pro Schale). Nach dem Aushärten wurden die Platten bei 4°C gelagert.

4.5.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Unter dem Einfluss einer niedrigen Wachstumstemperatur und einer Behandlung mit Manganchlorid und Calciumchlorid wird bei E.coli Bakterien eine poröse Zellwand induziert. Dadurch werden die Bakterien in die Lage versetzt, freie DNA aus dem Medium aufnehmen zu können [Inoue et al. [86]].

Eine Kolonie des E.coli Bakterienstammes DH5 α wurde zunächst von einer LB-Agar-Platte in 250 ml SOB Medium (Abschnitt 4.1.5.9) gegeben und bei 17°C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 vermehrt. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt, bevor sie bei 2.100 x g für 10 min und bei 4°C abzentrifugiert wurden. Die sedimentierten Zellen wurden in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer (siehe unten) resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nochmal abzentrifugiert, in 20 ml Transformationspuffer mit 7 % DMSO aufgenommen, 50 μ l Aliquots hergestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformationspuffer

Für den Puffer wurden zunächst die Chemikalien eingewogen, dann in 1 L dest. H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von 50 mL bei -20°C.

10 mL 1 M Hepes [10 mM]

15 mL 1 M CaCl₂ [15 mM]

250 mL 1 M KCl [250 mM]

55 mL 1 M MnCl₂ [55 mM]

4.5.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Plasmide können vervielfältigt werden, indem sie in kompetente Bakterien eingebracht werden und dann in den Bakterien vermehrt werden. Um zu verhindern, dass sich auch Bakterien ohne DNA vermehren, wird auf dem Plasmid ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz codiert, so dass die Bakterien ohne Plasmid nicht wachsen können.

Es wurde ein 50 µL Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA oder ein Ligationsansatz dazugegeben und die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 s auf 42°C erhitzt und auf einer Agarplatte verteilt, welche Ampicillin enthielt. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag hatten sich mehrere Kolonien gebildet, die das gewünschte Plasmid exprimierten.

4.5.9 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Im Allgemeinen wird bei dem Aufreinigen von Plasmid-DNA aus Bakterien immer in gleicher Weise verfahren; je nach der benötigten Menge wurden dafür unterschiedliche "Kits" verwendet.

1. Die gewachsenen Bakterienkolonien werden mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Agarplatte geerntet und in LB-Medium (Abschnitt 4.1.5.16) mit Ampicillin (100 µg/mL) über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag werden die Bakterien abzentrifugiert und in Resuspensionspuffer aufgenommen.
2. Die Bakterien werden mit Natronlauge und SDS lysiert, wodurch die DNA in Lösung geht. Übrige Zellbestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt.
3. Die DNA wird mit Isopropanol gefällt, sedimentiert, mit Ethanol gewaschen und in Wasser resuspendiert.

Es wurden sowohl Minipräparationen mit einem Volumen von 2,5 mL als auch Midi-präparationen mit einem Volumen von 250 mL nach Anleitung der verschiedenen Kits durchgeführt. Bei der Midipräparation wurde noch eine Vorkultur angesetzt; dazu wurden die geernteten Kolonien für 45 min bei 37°C in 10 mL antibiotikafreies Medium (Abschnitt 4.1.5.16) gegeben. Mit der Vorkultur wurde dann die 250 mL LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft.

4.5.10 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Nukleinsäurekonzentrationen wurden durch UV-Messung in einer Quarzküvette oder mit dem Nano Photometer von Implen bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die optische Dichte der Lösung bei 260 nm (OD_{260}) ist direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt. Für doppelsträngige DNA gilt: $OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA-Gehalt } [\mu\text{g/mL}]$. Um die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen zu bestimmen, wurde der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} ermittelt. Ist der Quotient kleiner als 1,8, deutet dies auf Verunreinigungen der Präparation mit Proteinen hin.

4.5.11 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten von 0,6 μg gelöster DNA kommerziell bei Seqlab AG, Göttingen. Dazu wurden 0,6 μg DNA und 0,2 pmol des jeweiligen Starternukleotids mit dest. H_2O auf 7 μl aufgefüllt.

4.5.12 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden spezifische DNA-Sequenzen, so dass DNA Fragmente definierter Länge entstehen. Die Enzyme können zur analytischen Kontrolle rekombinanter Plasmide oder zum präparativen Verdau größerer Mengen DNA verwendet werden.

Für einen analytischen Verdau wurden folgende Reagenzien in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert; anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel (Abschnitt 4.5.13) aufgetrennt und sichtbar gemacht.

0,6 μg	Plasmid-DNA
2,0 μL	Puffer, 10fach konzentriert (laut Herstellerangaben)
0,6 μL	Enzym
0,2 μL	RNase A (5 mg/mL) [10 $\mu\text{g/mL}$]

aufgefüllt auf 20 μL mit dest. H_2O .

4.5.13 DNA-Auftrennung mittels Elektrophorese

Nukleinsäuren können unter nativen Bedingungen aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen entsprechend ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt werden [87]. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid und von UV-Licht angeregt, werden doppelsträngige Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht.

Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst (1-2 %ige Gele, je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragmentes), mit 10 μL Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg/mL) versetzt und in eine entsprechende Elektrophorese-Gelkammer gegossen. Bei analytischen Gelen wurden die DNA-Proben (5-10 μL der PCR oder des Endonuklease-verdaus) mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer (Firma Fermentas) versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard (Firma Fermentas) in dem ausgekühlten Agarosegel bei 0,5-1 V/cm in TAE-Puffer aufgetrennt. Die DNA wurde unter UV-Beleuchtung (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis auf einem Foto dokumentiert.

50-fach Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Tris-Acetat-EDTA-Puffer wird für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt, wobei er als Elektrolyt dient. Für den 50-fach konzentrierten Puffer wurden die folgenden Chemikalien eingewogen und mit dest. H_2O auf 1 L aufgefüllt.

242,0 g Trisbase [2,000 M]

57,1 mL konz. Essigsäure [1,000 M]

37,2 g EDTA [127 mM]

4.6 Spezielle Messmethoden und Versuche

4.6.1 Mikroskopische Analyse der Zellmigration

Zellmigration kann auf verschiedene Arten quantifiziert werden. Weit verbreitet ist der so genannte Scratch-Assay. Hierbei wird aus einer Zellschicht ein Bereich frei gekratzt, der Zustand dokumentiert und nach einigen Stunden erneut überprüft.

Es wurden 200.000 Zellen in einer Zellschale mit 35 mm Durchmesser in Vollmedium (Abschnitt 4.14) ausgesät und dort 24 h inkubiert. Mit einer 20 μL Pipettenspitze wurde ein etwa 1 cm langer und 1 mm breiter Kratzer in die dichte Zellschicht gemacht, dessen

Ende an eine zuvor mit Filzstift vorgenommene Markierung grenzte. Unter einem Lichtmikroskop wurden die Zellen fotografiert und daraufhin wieder inkubiert. Nach einigen Stunden wurden die Zellen an der selben Stelle abermals fotografiert. Die so erhaltenen Bilder konnten anschließend am Computer ausgewertet werden.

4.6.2 Wundheilung-Test mit Hilfe des "electrical cell impedance sensor" Systems

Wie zuvor bei dem Migrationsassay wird auch beim Wundheilungsassay quantifiziert, wie schnell eine Zellschicht eine zugefügte Wunde schließen kann. Im Gegensatz zum Scratch-Assay wird die Wunde hier nicht mechanisch, sondern durch einen starken Strom an den Elektroden eines ECIS Gerätes (siehe [88]) gesetzt. Durch diesen werden Zellen, die auf den ECIS-Elektroden liegen, entfernt. Dadurch sinkt zuerst der Widerstand. Anschließend kann dann beobachtet werden, wie der Widerstand durch das Schließen der Zellwunde durch Proliferation oder Migration der Zellen wieder ansteigt.

Zellen wurden auf den ECIS-Elektroden wie in der Betriebsanleitung beschrieben ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde die Spezialsoftware zur Durchführung eines Wundheilungsassay aufgerufen. Die erhaltenen Daten wurden in Excel konvertiert und dort ausgewertet.

4.6.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} - Ionen Konzentration mittels Calcium Imaging

Der veresterte Farbstoff Fura-2-AM (Fura-2-acetoxymethylester) gelangt aufgrund seiner Lipophilie leicht durch die Membran ins Zellinnere. Durch intrazelluläre Esterspaltung durch Esterasen wird er hydrophil und kann nicht mehr in den Extrazellularraum zurückdiffundieren. Das Exzitationsmaximum des Ca^{2+} -beladenen Fura-2 befindet sich bei 340 nm, während es für das calciumionenfreie Fura-2 bei 380 nm liegt. Völlig calciumunabhängig ist eine Exzitationswellenlänge von 360 nm (isosbestischer Punkt).

Vereinfacht lässt sich sagen, dass der Quotient der gemessenen Fluoreszenz bei Anregung bei 340 nm und bei 380 nm ein Maß für die absolute intrazelluläre Calciumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) unabhängig von der Beladungseffizienz der Zelle durch den Calciumindikator Fura-2 ist. Moderne Calciumimaging-Systeme sind dabei in der Lage, innerhalb von Millisekunden fast simultan mehrere Wellenlängen zu messen. Eine Zelle wird mit dem Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen und durch ein Mikroskop beobachtet. Das Licht einer Hg-Dampflampe ist mittels eines Lichtleiters in das Mikroskop eingekoppelt. Aus dem Spektrum des Lampenlichts wird mit einem An-

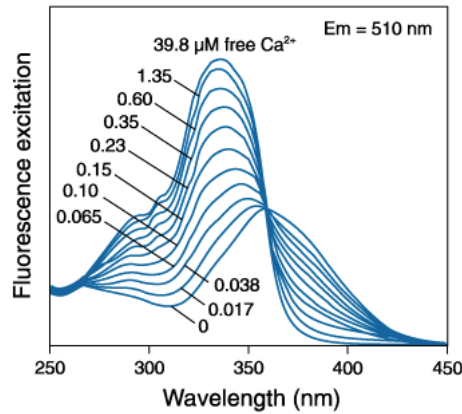


Abbildung 4.3: Isosbestischer Punkt der Fluoreszenz von Fura-2 (Abbildung nach [89]).

regungsfilter eine Wellenlänge herausgefiltert, die zur Fluoreszenzanregung geeignet ist (340 nm, 360 nm und 380 nm bei Fura-2). Ein dichroischer Spiegel reflektiert das Anregungslicht durch das Objektiv zur Zelle. Dadurch werden die Farbstoffmoleküle angeregt und es kommt zur Emission von Fluoreszenzlicht. Das längerwellige Fluoreszenzlicht (ca. 510 nm) kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird durch den Emissionsfilter auf ein enges Wellenlängenband (510 - 530 nm) eingeschränkt. Das Emissionslicht fällt in eine Kamera, die ein Bild der fluoreszierenden Zelle an den Rechner übermittelt, wo das Bild weiterverarbeitet wird. Bei der digitalen Bildverarbeitung wird jedem Wert der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Farbe zugeordnet. Niedrige Konzentrationen werden mit "kalten" Farben (blau, grün), höhere mit "warmen" Farbtönen (gelb, rot) dargestellt. Diese Falschfarbendarstellung erleichtert die optische Wahrnehmung kleiner Unterschiede im Messsignal.

4.6.3.1 Vorbereitungen

1. In einer 6-Loch Platte wurden Zellen in 2 mL des entsprechenden Mediums (Tabelle 4.14) auf Glasplättchen ausgesät und 24 h inkubiert.
2. Je nach Zelltyp wurden diese mit einem Plasmid transfiziert und weitere 48 h inkubiert.
3. Herstellen des Messpuffers.

HBSS-Puffer (HBSS = Hank's balanced salt solution)

Für den Puffer wurden die folgenden Chemikalien, bis auf Glukose, Calciumchlorid oder EGTA, eingewogen und mit dest. H_2O auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf

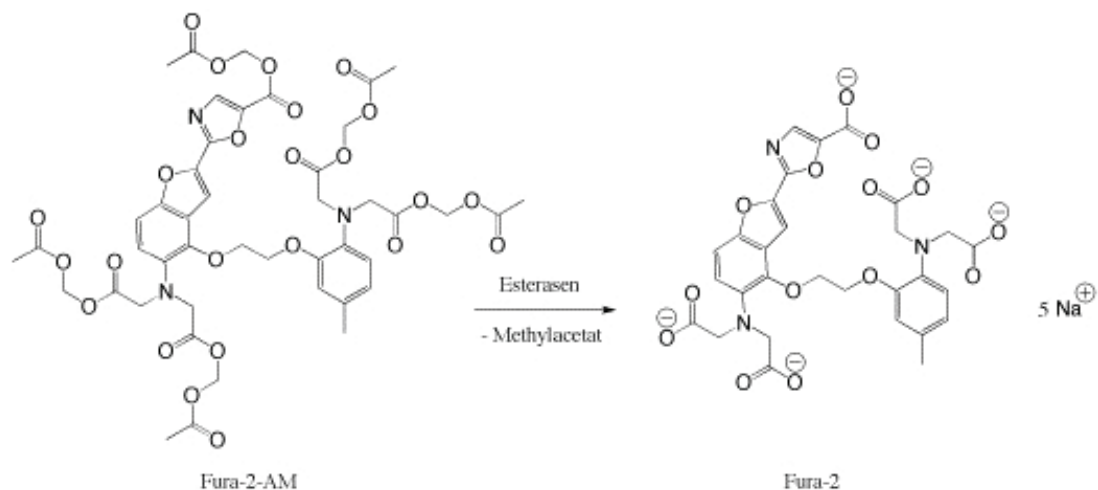


Abbildung 4.4: Spaltung von Fura-2-AM zu Fura-2

7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei RT. Vor der Verwendung wurde noch Glukose und je nach Anwendung 2,2 mM Calciumchlorid oder EGTA als Calciumionenchelator für eine Ca^{2+} freie extrazelluläre Lösung zugefügt.

28,0 mL 5,0 M NaCl [140 mM]

2,0 mL 2,5 M KCl [5 mM]

1,0 mL 1,0 M MgCl_2 [1 mM]

10,0 mL 1,0 M Hepes [10 mM]

4,5 mL 20 % Glukose [5 mM]

4.6.3.2 Beladen der Zellen

Das Nährmedium wurde von den Zellen entfernt und diese dreimal mit HBSS gewaschen. Dann wurde 1 mg Fura-2-AM (ca. 1000 g/mol) in 200 μl DMSO gelöst. Die entstandene 5 mM Lösung wurde je nach Empfindlichkeit der Kamera 1:1000 bis 1:10.000 in HBSS mit 0,1 % BSA verdünnt auf die Zellen gegeben. Diese wurden 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Puffer ersetzt, um ein Überladen der Zellen zu verhindern.

4.6.3.3 Messen der Zellen

Die Glasplättchen mit den Zellen wurden in die Messapparatur eingespannt und sofort mit 400 μL Puffer bedeckt.

Rezeptoraktivierung durch Agonisten in Anwesenheit von Ca^{2+}

Zu einem definierten Zeitpunkt wurde der Puffer mit dem Agonisten vorsichtig zu den Zellen pipettiert.

Wenn die Zellen durch den Agonisten mit einer Kanalöffnung reagieren, steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, wodurch das Fura-2 bei 340 nm stärker fluoresziert. Der Quotient aus 340 nm/380 nm gibt dann den Calciumanstieg unabhängig von der Menge des aufgenommenen Fura-2 an.

Es wurden folgende Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet: Angiotensin II, Carbachol, OAG.

Mangan-Quench

TRPC-Kanäle lassen auch andere Ionen als Ca^{2+} , z. B. Mn^{2+} , permeieren. Während durch Ca^{2+} -Ionen die Fura-2 Emission durch Exzitation bei 360 nm nicht verändert wird (isosbestischer Punkt), wird durch Mn^{2+} die Fura-2-Emission vermindert ("quenching"). In diesem Versuch werden nur Mn^{2+} -Ionen, die von außen durch geöffnete TRPC-Kanäle strömen, quantifiziert. Ein eventueller TRPC-unabhängiger Ca^{2+} -Ausstrom aus den internen Speichern wird nicht berücksichtigt.

Der Versuchsablauf war wie folgt:

1. 500 μL HBSS-Puffer mit 2,2 mM Calciumchlorid.
2. 500 μL HBSS-Puffer mit 2,2 mM Calciumchlorid und 4 mM Manganchlorid [2 mM].
3. 500 μL HBSS-Puffer mit 2,2 mM Calciumchlorid, 2 mM Manganchlorid [2 mM] und 300 μM Carbachol [100 μM].

Im Gegensatz zur direkten Messung wird hier kein Quotient genommen. Je stärker die Fluoreszenzemission nach Exzitation bei 360 nm abnimmt, desto mehr Ionen sind von außen in die Zelle eingeströmt.

4.6.4 Immunhistologische Zellfärbung der Podozyten

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können verschiedene Zellbestandteile sichtbar gemacht werden. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper können beispielsweise an Proteine binden und diese dadurch spezifisch markieren. 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) lagert

sich in die DNA ein und fluoresziert bei Anregung mit ultravioletterem Licht (358 nm) und im sichtbaren Bereich (461 nm). Es kann also verwendet werden, um die Zellkerne blau anzufärben. Podozyten können spezifisch mit einem Podocin-Antikörper angefärbt werden. Als Zweitantikörper kann ein FITC (Fluoresceinisothiocynat)-Antikörper verwendet werden. Dieser hat sein Absorptionsmaximum bei 485 nm und emittiert bei 514 nm, so dass eine Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich detektiert werden kann.

Es wurden 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte, in welche zuvor je ein Glasplättchen gegeben worden war, ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurde je 1 mL -20°C kaltes Methanol auf die Zellen gegeben und für 5 min bei -20°C inkubiert, um die Zellen auf dem Glasplättchen zu fixieren. Anschließend wurde 1 mL PBS mit 1 % BSA und 0,3 % Triton X-100 für eine Stunde bei 37°C zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellen zu permeabilisieren. 0,5 mL PBS mit 1 % BSA und dem ersten Antikörper (Podocin-Antikörper 10 µg/µL) wurden für zwei Stunden bei 37°C auf die Zellen gegeben, anschließend dreimal mit PBS gewaschen, dann 0,5 mL PBS mit 1 % BSA, 3,1 µL des zweiten Antikörpers und 2,5 µL DAPI (DAPI-Gebrauchslösung [5 ng/mL], FITC anti rabbit 1:160) zugefügt und ebenfalls für zwei Stunden bei 37°C, aber unter Lichtausschluss, inkubiert.

Es wurde ein Objektträger mit Einbettmedium vorbereitet (DAKO mounting medium), auf den das Glasplättchen mit der Zellseite nach unten aufgelegt wurde. Zuletzt wurde das Glasplättchen mit Nagellack am Objektträger fixiert. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop untersucht.

DAPI-Gebrauchslösung

Es wurde zunächst eine Stammlösung von 50 µg DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) pro Milliliter Methanol hergestellt. 1 mL Stammlösung wurde dann in 24,5 mL Methanol und 24,5 mL PBS gelöst. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert, die Gebrauchslösung bei 4°C. Diese wurde 1:200 eingesetzt.

4.6.5 Phalloidin-Färbung

Das Strukturprotein des Zytoskeletts Aktin kann mit einem Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*amanita phalloides*), welches an ein Fluoreszenzmolekül gekoppelt ist, gefärbt werden. Der Ablauf ist wie bei einer Antikörperfärbung.

Es wurden 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte, in welche zuvor je ein Glasplättchen gegeben worden war, ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurde je 1 mL -20°C kaltes Methanol auf die Zellen gegeben und für 5 min bei -20°C inkubiert, um die Zellen auf dem Glasplättchen zu fixieren.

Anschließend wurde 1 mL PBS mit 1 % BSA und 0,3 % Triton X-100 für eine Stunde bei 37°C zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellen zu permeabilisieren. 0,5 mL PBS mit 1 % BSA und 2,5 µL Phalloidin-TRITC (100 µg/mL) (Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat) wurden für 20 min bei RT unter Lichtausschluss auf die Zellen gegeben, anschließend dreimal mit PBS gewaschen, dann 0,5 mL PBS mit 1 % BSA und 2,5 µL DAPI (DAPI-Gebrauchslösung [5 ng/mL]) zugefügt und für 10 min bei RT inkubiert.

Abschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen. Es wurde ein Objektträger mit Einbettmedium vorbereitet (DAKO mounting medium), auf den das Glasplättchen mit der Zellseite nach unten aufgelegt wurde. Zuletzt wurde das Glasplättchen mit Nagellack am Objektträger fixiert. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop untersucht.

4.6.6 Apoptose-Untersuchungen

Es gibt verschiedene Arten des Zelltods. Hauptsächlich können zwei Arten unterschieden werden, die Apoptose und die Nekrose. Die Nekrose ist der passive Zelltod, die Zelle schwillt an, platzt, wodurch auch benachbarte Zellen mit zugrunde gehen können. Die Apoptose dagegen ist aktiv und wird als programmierter Zelltod bezeichnet. Die Zelle führt diesen Prozess selbst durch, schrumpft und baut die DNA ab. Eine hierbei beteiligte Enzymgruppe sind die Caspasen. Bei der Apoptose wird außerdem ein bestimmtes Protein, das Phosphatidylserin, auf die Außenseite der Zelle verlagert. Um nun herauszufinden, ob eine Zelle in Apoptose geht, können entweder die Caspasen oder das Phosphatidylserin nachgewiesen werden. Auslöser können Faktoren außerhalb oder innerhalb der Zelle sein. Man nennt dies den extrinsischen bzw. intrinsischen Weg. Beim extrinsischen Weg binden beispielsweise Zytokine an einen der sog. Todesrezeptoren der Zelle. Dieser kann dann die Signalkaskade auslösen, die zum Tod der Zelle führt. Beim intrinsischen Weg wird zum Beispiel durch Schädigung der DNA der Transkriptionsfaktor p53 freigesetzt, was ebenfalls zu einer entsprechenden Signaltransduktion führt.

4.6.6.1 Quantifizierung von Apoptoseraten mit Hilfe des TUNEL-Assays

Während der Apoptose von Zellen kommt es zu Strangbrüchen in der DNA. An den Bruchstellen entstehen freie OH-Gruppen. Das Enzym Tdt (= terminale desoxyribonukleotidyl transferase) ist in der Lage, Nukleotide an diese Stellen anzufügen. Mit einem speziellen Kit werden Uracile angefügt, welche einen Alkinrest haben. Dieser kann anschließend in einer Klick-Reaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Azid gekoppelt wer-

4 Material und Methoden

den. Unter einem Fluoreszenzmikroskop können apoptotische Zellen dann durch ihre grün leuchtende DNA im Zellkern identifiziert werden.

Es wurden 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte, in welche zuvor je ein Glasplättchen gegeben worden war, ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurde je 1 mL -20°C kaltes Methanol auf die Zellen gegeben und für 5 min bei -20°C inkubiert, um die Zellen auf dem Glasplättchen zu fixieren. Anschließend wurde 1 mL PBS mit 1 % BSA und 0,3 % Triton X-100 für eine Stunde bei 37°C zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Zellen zu permeabilisieren. Die Zellen wurden zweimal mit dest. Wasser gewaschen.

In der darauffolgenden Tdt-Reaktion wurden die Zellen zunächst mit 100 µL "Tdt reaction buffer" für 10 min bei RT equilibriert. Dann wurde eine Mischung aus 94 µL Puffer mit 2 µL der Nukleotide "EdUTP" und 4 µL des Enzyms "Tdt" zugegeben und die Mischung für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von zweimal 3 % BSA in PBS für jeweils 2 min.

Für die Klick-Reaktion wurden nun 97,5 µL "Click-iT reaction buffer" mit 2,5 µL "Click-iT buffer additive" zugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend wurden die Zellen für 5 min in 3 % BSA in PBS gewaschen.

Für eine Kernfärbung wurden 100 µL Hoechst 33342 (10µg/mL) in PBS zu den Zellen gegeben und weitere 15 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert.

Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es wurde ein Objektträger mit Einbettmedium vorbereitet (DAKO mounting medium), auf den das Glasplättchen mit der Zellseite nach unten aufgelegt wurde. Zuletzt wurde das Glasplättchen mit Nagellack am Objektträger fixiert. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop untersucht.

4.6.6.2 Apoptose-Untersuchung durch Annexin-Färbung

Der Nachweis der Apoptose in der Zelle mittels Annexin wird ähnlich wie eine immunhistologische Zellfärbung durchgeführt. Allerdings wird hier das extrazellulär in der Plasmamembran eingebaute Phosphatidylserin durch ein fluoreszenzgekoppeltes Annexin detektiert. Normalerweise ist Phosphatidylserin an der Innenseite der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. Doch nach Auslösung einer Apoptose wandert es an die Außenseite. Das fluoreszenzgekoppelte Annexin kann die intakte Zellwand nicht durchdringen, daher werden nur Zellen gefärbt, bei denen entweder das Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellwand lokalisiert ist oder die, deren Zellwand defekt ist, die also nekrotisch sind. Um diese Zellen unterscheiden zu können, wird mit Propidiumiodid gegengefärbt. Propidiumiodid ($C_{27}H_{34}I_2N_4$) interkaliert in die DNA, kann jedoch nur die Zellwand von

perforierten, toten Zellen durchdringen und färbt so die DNA nekrotischer Zellen an.

Es wurden 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte, in welche zuvor je ein Glasplättchen gegeben worden war, in dem entsprechenden Nährmedium (Tabelle 4.14) ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Abschnitt 4.1.5.1) wurden 500 μL Annexin-Puffer mit 25 μL Alexa Fluor[®] 488 annexin V und 5 μL Propidiumiodid (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) auf die Zellen gegeben und 15 min inkubiert. Es wurde ein Objektträger mit Einbettmedium vorbereitet (DAKO mounting medium), auf den das Glasplättchen mit der Zellseite nach unten aufgelegt wurde. Zuletzt wurde das Glasplättchen mit Nagellack am Objektträger fixiert. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop untersucht. Zellen, an die das Annexin gebunden war, emmitierten bei 530 nm und leuchteten dann grün, Zellkerne nekrotischer Zellen leuchteten bei 575 nm rot.

4.6.6.3 Bestimmung der Apoptoseeigenschaften von Zellen mit CaspaseGlow

Das CaspaseGlo 3/7 Substrat von Promega wird spezifisch durch eben diese Caspasen gespalten. Hierbei entsteht Luciferin, welches durch eine im Assay enthaltene Luciferase ein Lumineszenzsignal abgibt [90].

Es wurden 10.000 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und 24 h inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und eine Mischung aus 50 μL Vollmedium (Tabelle 4.14) mit 50 μL des Substrats zu den Zellen pipettiert. Als Leerwert wurden in ein leeres Loch ebenfalls 100 μL dieser Lösung gegeben. Die Zellen wurden 60 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und dann in einem Analysegerät für Fluoreszenz vermessen.

4.6.7 Messung der Zellviabilität mit dem WST (water soluble tetrazolium)-Assay

Bei diesem Assay wird das WST-1(= water soluble tetrazolium) Substrat durch Prozesse an der Zelloberfläche NADPH-abhängig gespalten. Das hierbei entstehende Formazan ist rot und kann photometrisch bestimmt werden. Die gemessene Absorption ist direkt abhängig von der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen und damit ein Marker für die Zellviabilität [91].

Es wurden 10.000 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und 24 h inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und 50 μL Vollmedium (Tabelle 4.14) mit 10 % WST-1 Reagenz von Roche zu den Zellen pipettiert. Als Leerwert wurden in ein leeres Loch ebenfalls 50 μL dieser Lösung gegeben. Die Zellen wurden 85 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, weitere 5 min bei RT, dann wurden die Zellen in einem Plattenphotometer bei 450 nm vermessen.

4.6.8 Inhibition der Rho-Proteine mit spezifischen Toxinen

Mit bestimmten Toxinen ist es möglich Rho-Proteine zu inhibieren. Die Toxine wurden von einer anderen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, weshalb für die Konstruktion und Produktion der Toxine auf deren Veröffentlichung verwiesen wird [92, 93]. Das System besteht aus zwei Komponenten, zum einen C2IIa, zum anderen C2IN-C3. C2IIa stellt eine proteolytisch aktivierte Untereinheit des C2II dar. Es bildet heptamere Strukturen, welche an die Rezeptoren binden können [93]. C2IN-C3 ist das Toxin, welches in der Lage ist, die kleinen GTP-bindenden Rho-Proteine durch ADP-Ribosylierung zu hemmen [92]. Letztlich ist es also notwendig beide Komponenten zu komplexieren, um eine Hemmung der Rho A, B und C-Proteine zu erreichen.

Primäre Podozyten wurden in 6-Loch Platten auf Glasplättchen ausgesät (100.000 Zellen/Loch) und 24 h kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch 2 mL Medium mit 200 ng/mL C2IN-C3 und 100 ng/mL C2IIa ersetzt. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen im Calcium-Imaging vermessen (siehe Abschnitt 4.6.3 und [92]).

4.6.9 Inhibition der $G_{\alpha 12/13}$ -Proteine mit Hilfe von spezifischen shRNAs

Es ist möglich, mit Hilfe von small hairpin RNAs (shRNAs) gezielt die Translation bestimmter Proteine zu inhibieren. Die shRNAs können mit verschiedenen Transfektionsmethoden in die Zielzellen eingebracht werden. Hier wurde die sehr effektive Virusinfektion gewählt. Die verwendeten shRNAs wurden bereits von Dr. Hermann Kalwa etabliert und in rekombinante Viren eingebracht [94].

Die fertigen Viren mit zum einen der Kontroll-shRNA, zum anderen den $G_{\alpha 12/13}$ -shRNAs wurden von der Arbeitsgruppe Aigner zur Verfügung gestellt.

Die Infektion der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben. Die Zellen wurden anschließend im Mangan-Quench vermessen (siehe Abschnitt 4.6.3).

4.6.10 Klonierung des mTRPC1

Es sollte ein Plasmid erstellt werden, welches die cDNA-Sequenz des murinen TRPC1 enthält. Dazu muss zunächst Gesamt-RNA gewonnen werden, in der die entsprechende mRNA enthalten ist, diese kann dann in cDNA umgeschrieben werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Wenn mittels Real-Time-PCR der RNA-Gehalt bestimmter Gene bestimmt werden soll, muss das Oligonukleotid zufällig irgendwo binden, wie es beim Random Hexamer Oligonukleotid der Fall ist. Wenn jedoch ein möglichst langer Strang gebildet werden soll, muss das Oligonukleotid an den Poly-Adenosin-Schwanz der mRNA binden. Deshalb wird hier ein

4 Material und Methoden

Oligomer mit 18 Thymidin Basen (Oligo dT18) verwendet. Da die Sequenz sehr lang ist und nicht in einem PCR-Zyklus vervielfältigt werden kann, müssen anhand der bekannten Sequenz weitere Oligonukleotide für den Einsatz weiterer PCR-Reaktionen synthetisiert werden. Um die Sequenz möglichst fehlerfrei zu erhalten, wird hier eine Polymerase mit hoher Genauigkeit (sog. *proof-reading* Aktivität) in der PCR verwendet, z. B. die Phusion Polymerase von Finnzymes. Mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen ist es möglich eine beliebige DNA-Sequenz in einen Vektor einzubringen. Hierfür muss die DNA-Sequenz allerdings Poly-Adenosin-Überhänge haben, die durch eine weitere kurze PCR mit Taq-Polymerase angefügt werden können. Anschließend ist die DNA-Sequenz in einem Vektor, in dem sie als Plasmid in Bakterien vermehrt werden kann. Falls sie in mehreren Teilen amplifiziert worden ist, kann sie dann durch Restriktionsverdaue und anschließende Ligation zusammengefügt werden.

Aus einer Wildtyp Maus wurde das Gehirn entnommen und in 1 mL Trifast homogenisiert. Die RNA wurde wie zuvor beschrieben isoliert (Abschnitt 4.5.1) und mit Oligo dT18 in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 4.5.2). Anschließend wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, die eine für den Start der kodierenden Sequenz mit einer speziellen Restriktionsschnittstelle am Ende, die andere mit eben dieser Restriktionsschnittstelle am Anfang und mit dem Ende der kodierenden Sequenz am Schluss (Oligonukleotide in Abschnitt 4.1.8.4).

Der Pipettieransatz war der Folgende:

5 µL	HF Puffer
0,5 µL	dNTPs (10 mM)
1,25 µL	Vorwärtsoligonukleotid (10 pmol/µL) (mTRPC1 START oder mTRPC1 forward BstEII)
1,25 µL	Rückwärtsoligonukleotid(10 pmol/µL) (mTRPC1 reverse BstEII oder mTRPC1 STOP)
15,75 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA, auf 1/10 verdünnt
0,25 µL	Phusion Polymerase

Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt:

98°C	5 min
------	-------

Start Zyklus, 41 Wiederholungen

98°C 30 s

57°C 1 min

72°C 2,5 min

Ende Zyklus

72°C 10 min

4°C 5 min

Anschließend wurden der *blunt end* DNA Poly-Adenosin-Überhänge angefügt. Hierfür wurden zu dem PCR-Produkt 0,5 µL Taq-Polymerase und 0,5 µL dNTPs gegeben und der Ansatz 30 min bei 72°C inkubiert. Kleine Fragmente und Taq-Polymerase konnten entfernt werden, indem die Proben über ein 1 % Agarose Gel mit 10 µL Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg/mL) aufgetrennt und die entsprechende Bande ausgeschnitten wurde. Die DNA wurde dann über das Glasmilchreinigungskit von Quiagen nach Anleitung aus dem Gel extrahiert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem TOPO-TA Cloning Kit von Invitrogen in den Vektor einkloniert, indem 2 µL DNA, 0,5 µL Salt Solution und 0,5 µL Vektor zusammengegeben und 15 min bei RT inkubiert wurden. Die Klonierungsansätze wurden in kompetenten Bakterien vermehrt (Abschnitte 4.5.8, 4.5.9). Anschließend konnten die beiden Fragmente von mTRPC1 über die BstEII Schnittstelle, durch den Restriktionsverdau mit BstEII und NotI und anschließender Ligation (Abschnitt 4.5.4) zusammengesetzt werden. Das entstandene Plasmid enthält die kodierende Sequenz 472-2901 des mTRPC1 im pcDNA3-1-V5-His-TOPO-Vektor. y

4.6.11 Fusion der mTRPC1 mRNA mit der codierenden Region eines Hämagglutinin-Epitops

Die zuvor in Abschnitt 4.6.10 klonierte mTRPC1-cDNA wurde mit der codierenden Region des Hämagglutinin (HA)-Epitops fusioniert. Das verwendete synthetisierte Oligonukleotid enthielt die HA-Sequenz, so dass diese während einer PCR-Reaktion mit dem spezifischen Oligonukleotid in die mTRPC1-Sequenz eingefügt werden konnte. Anschließend wurde die Sequenz wieder aus zwei Teilen zusammengesetzt.

Der Pipettieransatz war der Folgende:

5 µL HF Puffer

4 Material und Methoden

0,5 µL	dNTPs (10 mM)
1,25 µL	Vorwärtsoligonukleotid (10 pmol/µL) (mTRPC1 472-HA-490 oder mTRPC1 forward BstEII)
1,25 µL	Rückwärtsoligonukleotid(10 pmol/µL) (mTRPC1 reverse BstEII oder mTRPC1 2901-HA-2883 revcom)
15,75 µL	H ₂ O
1 µL	mTRPC1 im TOPO-Vektor, 1 ng/µL
0,25 µL	Phusion Polymerase

Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt:

98°C 5 min

Start Zyklus, 41 Wiederholungen

98°C 30 s

57°C 1 min

72°C 2,5 min

Ende Zyklus

72°C 10 min

4°C 5 min

Anschließend wurden den sog. *blunt end* DNA Enden Poly-Adenosin-Überhänge angefügt. Hierfür wurde zu dem PCR-Produkt 0,5 µL Taq-Polymerase und 0,5 µL dNTPs gegeben und der Ansatz 30 min bei 72°C inkubiert. Kleine Fragmente und Taq-Polymerase konnten entfernt werden, indem die Proben über ein 1 % Agarose Gel mit 10 µL Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg/mL) aufgetrennt und die entsprechende Bande ausgeschnitten wurden. Die DNA wurde dann über das Glasmilchreinigungskit von Qiagen nach Anleitung aus dem Gel extrahiert. Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden mit dem TOPO-TA Cloning Kit von Invitrogen in den Vektor inkloniert, indem 2 µL DNA, 0,5 µL Salzlösung und 0,5 µL Vektor zusammengegeben und 15 min bei RT inkubiert wurden. Die Klonierungsansätze wurden in kompetenten Bakterien vermehrt (Abschnitte 4.5.8, 4.5.9). Um nun entweder aminoterminal oder carboxyterminal von

der TRPC1 Sequenz sowie an beiden Enden ein Hämagglutinin-Epitop zu fusionieren, wurden die beiden Fragmente aus diesen Versuch und aus der mTRPC1-Klonierung in Abschnitt 4.6.10 miteinander über die BstEII Schnittstelle durch den Restriktionsverdau mit BstEII und NotI und anschließender Ligation (Abschnitt 4.5.4) zusammengesetzt, so dass drei unterschiedliche Plasmide entstanden.

4.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm der Graph Pad Prism Software. Zur Überprüfung ob statistisch signifikante Unterschiede in Experimenten vorliegen wurde entweder der ungepaarte T-Test oder eine einseitige ANOVA durchgeführt. Als Post-hoc Test wurde hier der Tukey-Test verwendet. * entspricht $p \leq 0,05$; ** entspricht $p \leq 0,01$; *** entspricht $p \leq 0,001$.

Der T-Test dient dem Vergleich von Mittelwerten, wobei entschieden werden kann, ob sich die Mittelwerte von zwei Gruppen systematisch oder zufällig unterscheiden. Für die statistische Auswertung von mehr als zwei Gruppen in einem Experiment dient die ANOVA.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der TRPC1-Prozessierung und -Funktion

5.1.1 Heterologe Expression eines murinen TRPC1-Kanals

5.1.1.1 Klonierung einer murinen TRPC1 cDNA

Zur heterologen Expression des TRPC1-Kanals ist eine murine TRPC1-cDNA essentiell, die aus murinen Mausgeweben kloniert werden kann.

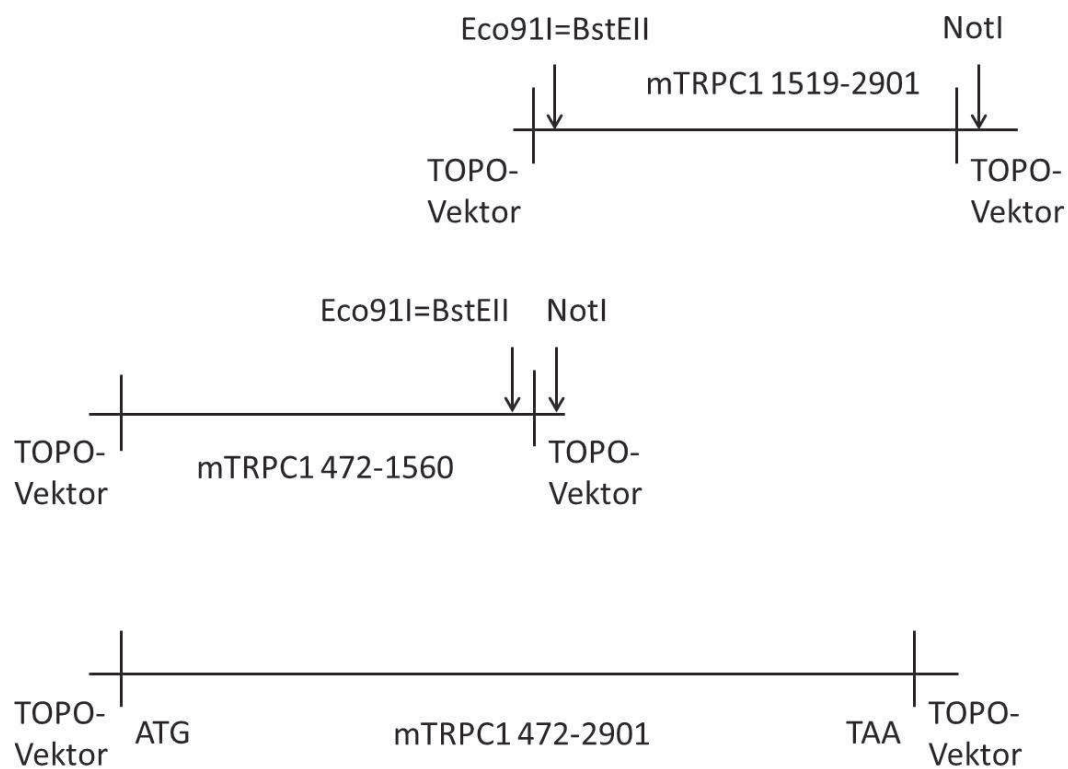


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der mTRPC1-cDNA. Siehe Text für weitere Details.

Es wurden zunächst verschiedene Strategien ausprobiert, in denen die gesamte DNA an einem Stück isoliert werden sollte, erfolglos. Die Strategie, mit der es letztlich gelungen ist, die komplette TRPC1-cDNA zu klonieren, ist in Abbildung 5.1 dargestellt und in Abschnitt 4.6.10 beschrieben. Die TRPC1-cDNA wurde zunächst in zwei Teilen isoliert und in einen Vektor kloniert, um anschließend über eine Ligation zusammengefügt zu werden. Die Korrektheit der Sequenz wurde mittels kommerzieller Sequenzierung überprüft.

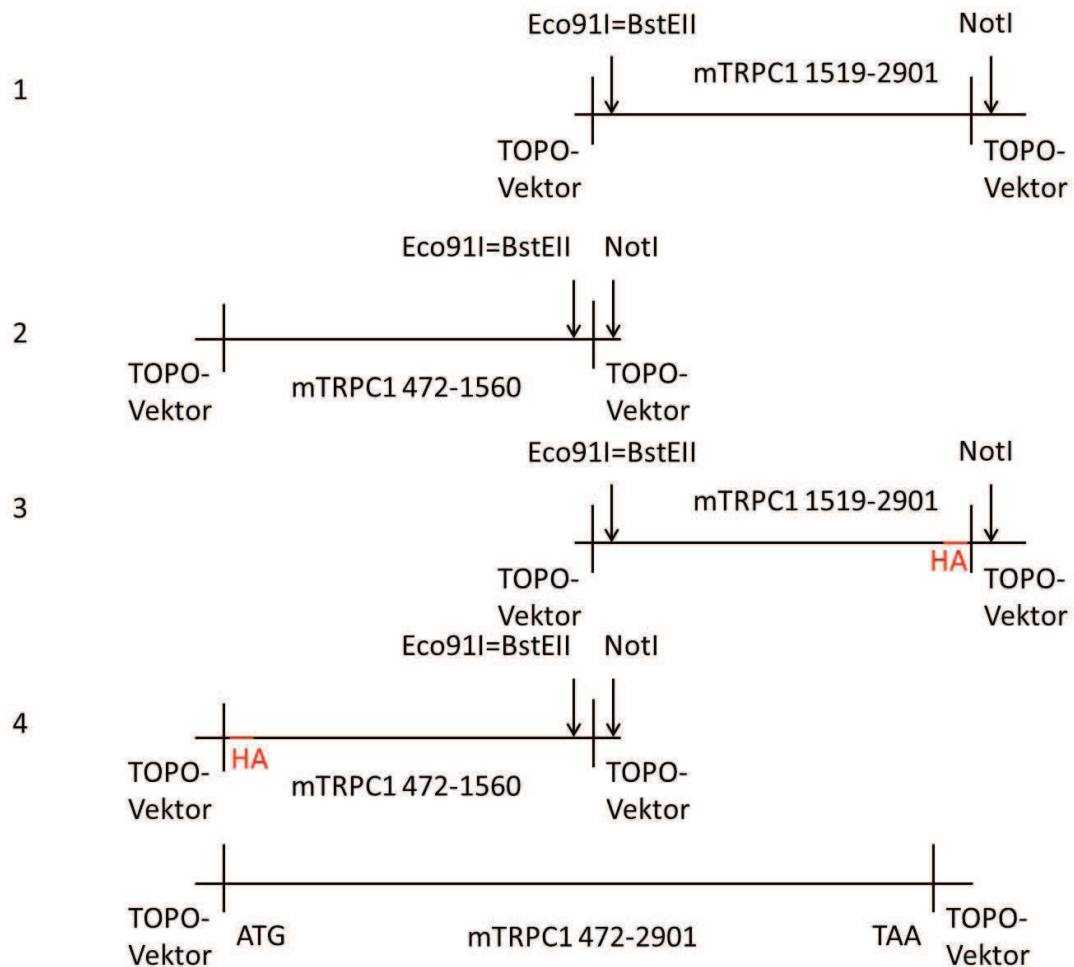


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der mTRPC1-cDNA zur aminoterminalen oder carboxyterminalen Expression eines Hämagglutinin-Epitops

In weiteren Schritten konnte dann das Hämagglutinin-Epitop mit der Sequenz fusioniert werden. Die Sequenz für das Epitop wurde zwischen Promotor und Startcodon (ATG) der cDNA zur aminoterminalen Fusion mit dem Protein eingefügt. Weitere Konstrukte enthalten die Epitop-Sequenz vor dem Stopcodon (TAA) der cDNA zur carboxyterminalen Fusion des Epitops mit dem TRPC1-Protein und an beiden Positionen.

Durch die Kombination der verschiedenen cDNA-Fragmente aus den DNA-Konstrukten, die in Abbildung 5.2 dargestellt sind, wurden folgende Plasmide kloniert:

cDNA-Fragmente aus Konstrukten 2 + 3 zur Klonierung einer mTRPC1-HA-cDNA

cDNA-Fragmente aus Konstrukten 4 + 1 zur Klonierung einer HA-mTRPC1-cDNA

cDNA-Fragmente aus Konstrukten 3 + 4 zur Klonierung einer HA-mTRPC1-HA-cDNA

5.1.1.2 Heterologe Expression des murinen TRPC1-Kanals und Nachweis der Expression im Western Blot

Die murinen TRPC1-cDNAs konnten nun in HEK293-Zellen transient transfiziert werden und die entsprechenden Proteine nach heterologer Expression im Western Blot (siehe Abschnitt 4.4.7) nachgewiesen werden.

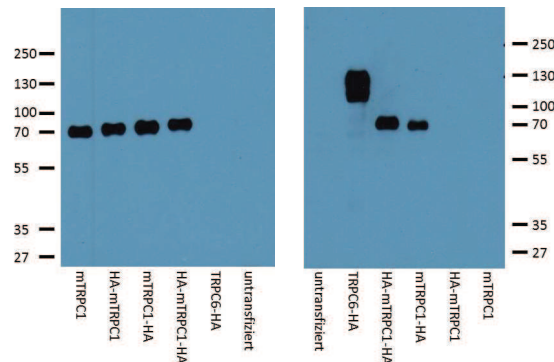


Abbildung 5.3: Heterologe Expression der murinen TRPC1-cDNA in HEK293-Zellen. Im Western Blot wurden Proteinlysate aus nicht transfizierten (untransfiziert) und mit cDNAs transfizierten Zellen (mTRPC1, HA-mTRPC1, mTRPC1-HA, HA-mTRPC1-HA, TRPC6-HA) aufgetragen. Der linke Teil des Blots wurde mit einem spezifischen TRPC1-Antikörper der Maus aus der Arbeitsgruppe Tsiokas und der rechte Teil des Blots mit einem Hämagglutinin (HA)-spezifischen Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle wurde auch der TRPC6-Kanal mit Hämagglutinin-Epitop exprimiert.

Es wurden Proteinlysate aus untransfizierten HEK293-Zellen mit Lysaten aus HEK293-Zellen, die mit verschiedenen TRPC1-cDNA-Konstrukten transfiziert worden waren, verglichen (siehe Abbildung 5.3). Die HEK293-Zellen waren wie im Methodenteil beschrieben mit den jeweiligen Plasmiden mit Hilfe des Transfektionsreagenz TransIT transfiziert und anschließend in Laemmli Puffer abgeerntet worden. Die Lysate wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und schließlich im Western Blot nachgewiesen. Hierfür wurden ein TRPC1-spezifischer Antikörper und ein für das Hämagglutinin-Epitop-spezifischer Antikörper verwendet.

In Abbildung 5.3 links ist deutlich zu erkennen, dass alle Zellen, die mit Plasmiden mit der TRPC1-cDNA transfiziert wurden, das TRPC1-Protein, das vom TRPC1-spezifischen Antikörper erkannt wird, exprimieren. Im rechten Teil des Blots erkennt der Hämagglutinin-spezifische Antikörper einige der heterolog exprimierten TRPC1-HA-Fusionsproteine und das TRPC6-HA-Fusionsprotein, aber nicht das murine TRPC1 Protein und kein Protein in untransfizierten HEK293-Zellen. Interessanterweise wird aber das TRPC1-Protein mit einem aminoterminal-fusionierten HA-Epitop von dem HA-Antikörper nicht erkannt (rechter Teil des Blots), obwohl das TRPC1-Protein exprimiert und vom TRPC1-Antikörper detektiert wird (linker Teil).

5.1.1.3 Untersuchungen zur enzymatischen Prozessierung des mTRPC1-Proteins durch Applikation von Proteaseinhibitoren

Eine mögliche Erklärung, warum das TRPC1-Protein kein Hämagglutinin-Epitop aminoterminal trägt, wäre eine Abtrennung des Aminoterminus durch proteolytische Enzyme (Proteasen) während der Präparation aus den HEK293-Zellen. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit den verschiedenen mTRPC1-Plasmiden transfiziert und anschließend Proteinlysate in unterschiedlichen Puffern mit oder ohne Proteaseinhibitoren, zur Blockade einer Proteolyse am Aminoterminus, abgeerntet.

Die verschiedenen Puffersysteme zum Abernten der Proteinlysate sind folgende:

1. 25 mM Tris/HCl, pH = 7,4
2. 25 mM Tris/HCl, pH = 7,4 mit Protease Inhibitor Tabletten
3. 25 mM Tris/HCl, pH = 7,4 mit Protease Inhibitor Tabletten + Trypsin Inhibitor (2 µg/mL)

5 Ergebnisse

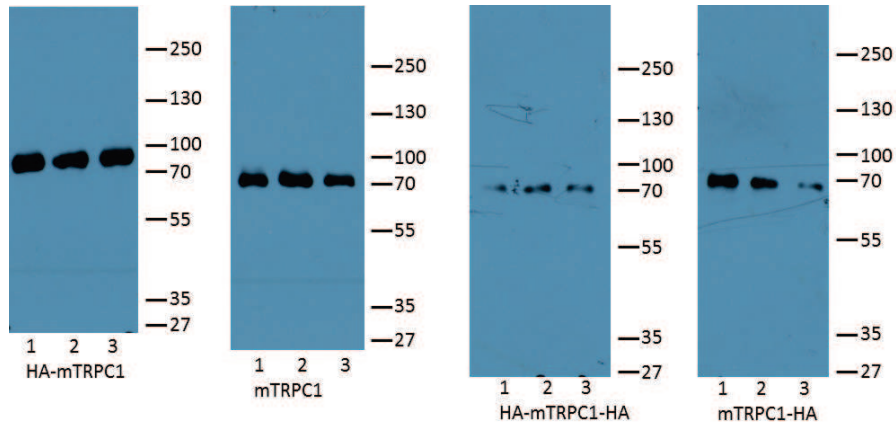


Abbildung 5.4: Western Blot mit Lysaten (5 µg/Bahn) mTRPC1-transfizierter HEK293-Zellen, die unter verschiedenen Pufferbedingungen abgeerntet wurden. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit einem TRPC1-spezifischen Antikörper der Arbeitsgruppe Tsiokas.

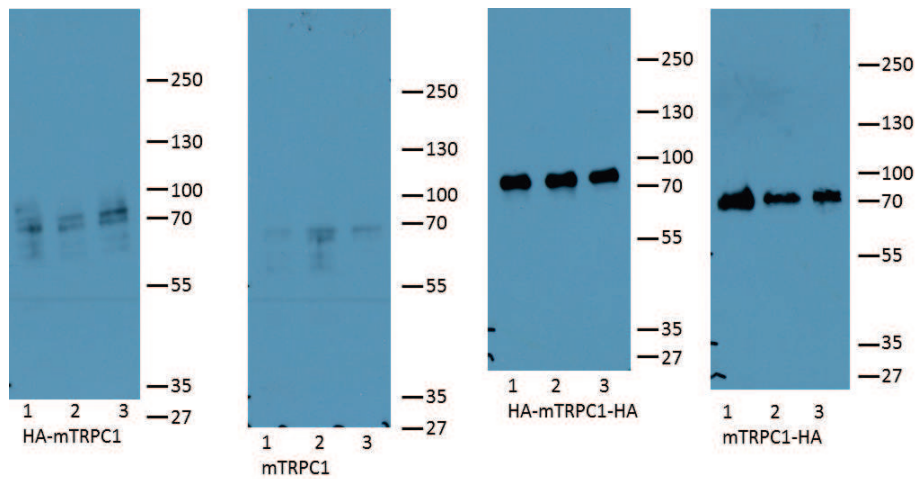


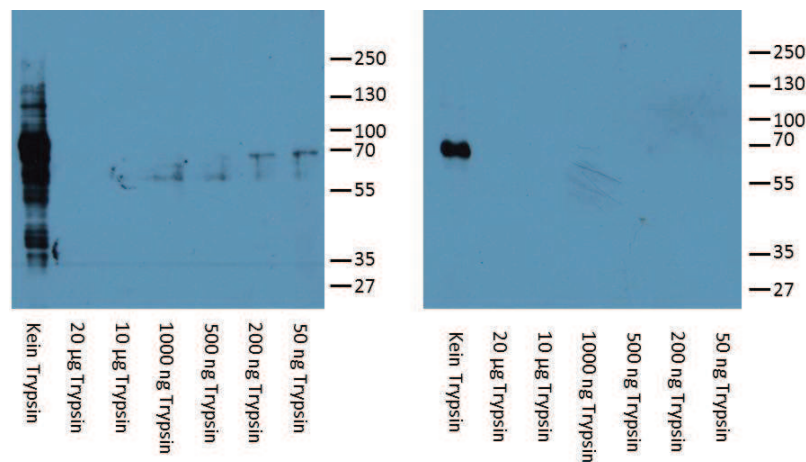
Abbildung 5.5: Western Blot mit Lysaten (5 µg/Bahn) mTRPC1-transfizierter HEK293-Zellen, die unter verschiedenen Pufferbedingungen abgeerntet wurden. Der Nachweis erfolgte durch Inkubation mit einem Hämagglutinin-spezifischen Antikörper.

In den Abbildungen 5.4 und 5.5 lassen sich keine großen Unterschiede bei den verwendeten Puffern erkennen. Die Applikation von Proteaseinhibitoren scheint im Gegenteil

sogar zu einer geringeren Proteinausbeute zu führen. Auch nach Applikation von Proteaseinhibitoren lassen sich durch den Hämagglutinin-Antikörper keine Proteinbanden des aminoterminal mit Hämagglutinin fusionierten TRPC1-Proteins, so, wie bei den beiden anderen Fusionsproteinen (HA-mTRPC1-HA und mTRPC1-HA) in Abbildung 5.5 erkennen. Als Negativkontrolle dient hier das nicht fusionierte mTRPC1-Protein, das durch den Hämagglutinin-Antikörper nicht erkannt werden kann.

5.1.1.4 Proteolyse des TRPC1-Kanals durch Trypsin

Die Proteinsequenz des TRPC1-Kanals zeigt viele potenzielle Stellen, an denen eine Spaltung durch Trypsin stattfinden kann. Um die wirklichen Trypsinspaltstellen zu identifizieren, wurde ein partieller Trypsinverdau des TRPC1-Proteins, ähnlich wie für die PLC β 2 beschrieben [95], durchgeführt. Neben einer 60 kD großen Proteinbande, die durch den TRPC1-Antikörper erkannt wurde, ließen sich jedoch keine weiteren partiellen Trypsinfragmente nach Inkubation mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen identifizieren (siehe Abbildung 5.6). Wahrscheinlich sind die meisten Trypsinerkennungsstellen dem Trypsinverdau zugänglich, so dass das TRPC1-Protein sehr schnell in kleine Bruchstücke gespalten wird.



Abbildungung 5.6: Trypsin-Verdau eines Zelllysats von HEK293-Zellen, die zuvor mit HA-mTRPC1-HA transfiziert worden waren. Links Nachweis mit einem TRPC1-spezifischen Antikörper der Maus der Arbeitsgruppe Tsiokas, rechts mit einem HA-spezifischen Antikörper. Die Verdauzeit durch Trypsin betrug 15 min bei 37°C.

5.1.2 TRPC1 in primären embryonalen Fibroblasten der Maus

5.1.2.1 Vergleichende Analyse von embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) aus TRPC1-defizienten- und Wildtyp-Mäusen

Nach der Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) aus TRPC1-defizienten- und Wildtyp (WT)-Mäusen wurde ein Test zur Zellviabilität durchgeführt, der sogenannte WST-Test. Bei dieser Analysemethode wird das WST (water soluble tetrazolium)-Substrat durch die intakte Atmungskette einer Zelle in das rot gefärbte Formazan umgewandelt, das spektralphotometrisch quantifiziert werden kann. Die gemessene Absorption ist direkt abhängig von der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen und damit ein Marker für die Zellviabilität. In Abbildung 5.7 ist eine signifikante Erhöhung der Zellviabilität der TRPC1-defizienten Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen zu erkennen.

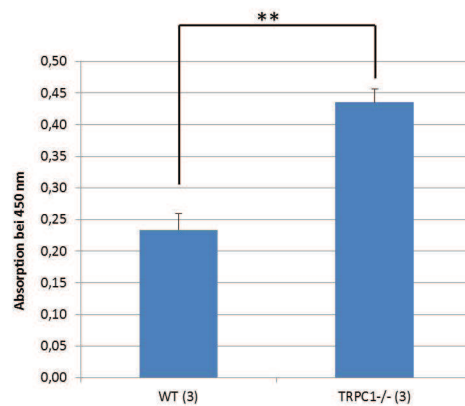


Abbildung 5.7: Analyse der Zellviabilität der MEFs. Zellen von WT-Tieren wurden mit Zellen von TRPC1-defizienten Tieren verglichen. Die Anzahl der Klone ist unter den Balken in Klammern dargestellt. WT = Wildtyp-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem "student's t-test" ** = $p < 0,01$.

5.1.2.2 Analyse der Migration und Proliferation der embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) in einem Test auf Wundheilung

Die Proliferation und Migration lebender Zellen kann durch die sog. Wundheilungsrate bestimmt werden. Ein sogenannter Wundheilungsassay wurde im ECIS (Electrical Cell Impedance Sensing)-Apparat durchgeführt. Wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt

5 Ergebnisse

4.6.2) wurden die MEFs in die Kammern des ECIS-Gerätes ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde der Assay gestartet. Zellen auf den Elektroden in den Messkammern wurden durch einen starken Spannungspuls abgetötet und abgelöst, so dass der gemessene Widerstand schlagartig sank. In den nächsten Stunden konnte nun beobachtet werden, wie die Zellen durch Migration oder Proliferation den zellfreien Bereich besiedeln. Die Geschwindigkeit kann über die Steigung der Ausgleichsgeraden der Wachstumskurve bestimmt werden.

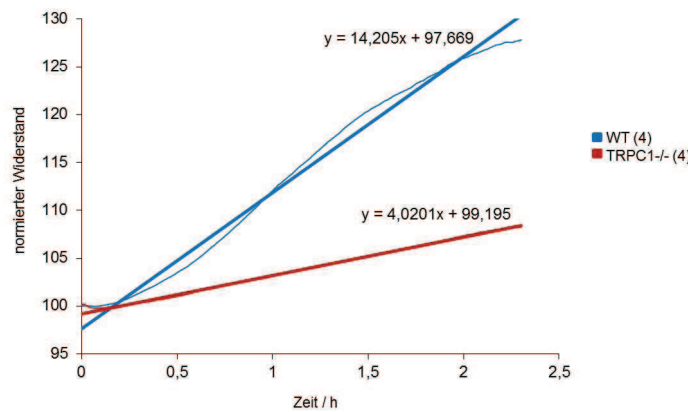


Abbildung 5.8: Wundheilungsassay der MEFs im ECIS-System. Die Geraden wurden mathematisch an die jeweiligen Wachstumskurven angepasst, um die Steigung (TRPC1-/-: 4,02; WT: 14,20) zu errechnen. In Klammern ist die Zahl der durchgeführten Experimente mit einem Klon der MEFs des jeweiligen Genotyps angegeben.

In Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass der Anstieg des Widerstands durch die Proliferation oder Migration der WT-Fibroblasten deutlich schneller erfolgt als der der TRPC1-defizienten Zellen. Der Anstieg des Widerstands gibt an, wie schnell die Zellen die Elektrode wieder besiedeln. Die WT-Zellen haben daher eine mehr als dreimal so hohe Migrations- oder Proliferationsrate.

5.2 TRPC6 -PLC ϵ -Interaktion in Podozyten der Niere

5.2.1 Immunhistologische Untersuchungen von Podozyten

Für alle in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden primäre Podozyten verwendet. Das Verfahren zu deren Isolation besteht aus einer seriellen Filtration von Glomeruli aus Nieren zehn Tage alter Mäuse und einer Kultivierung von Podozyten mittels eines Selektionsmediums über mehrere Wochen (siehe [82] und Abschnitt 4.3.1). Durch Anfärben der Zellen mit einem Podocin-spezifischen Antikörper ist die genaue Identifikation der Podozyten möglich. In Abbildung 5.9 sind primär isolierte Podozyten, die mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Podocin Antikörper angefärbt wurden, dargestellt.

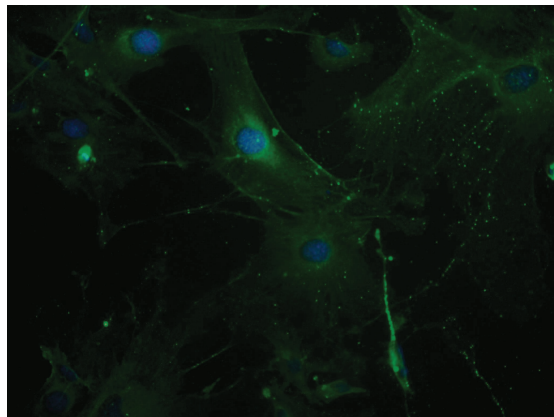


Abbildung 5.9: Anfärbung von Wildtyp-Podozyten mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Podocin-Antikörper. Zellkerne wurden durch Inkubation mit DAPI gefärbt.

5.2.2 Analyse der mRNA-Expressionsprofile in Podozyten mittels quantitativer "real time PCR"

Die Expressionsprofile von TRPC-Kanälen können mit Hilfe der quantitativen real time PCR im light cycler der Firma Roche ermittelt werden.

Wie man in Abbildung 5.10 deutlich sieht, ist die mRNA-Expression der TRPC1- und TRPC4-Kanäle in den PLC ϵ -defizienten und TRPC6- und PLC ϵ -defizienten Podozyten im Vergleich zu Wildtyp-Podozyten deutlich erhöht. Die TRPC6-/- -Podozyten zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen signifikant reduzierte TRPC6-mRNA-Level. Eine Ursache für diese Veränderungen könnte die Deletion des Exons 7 im Genom der TRPC6-defizienten Mäuse und eine daraus resultierende Instabilität der mRNA sein. Ein TRPC6-Protein konnte aber in den TRPC6-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden [79]. Die Erhö-

hung der TRPC1, TRPC4- und TRPC6-mRNA Expression in PLC ϵ -defizienten Mäusen ist wahrscheinlich auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen, der wiederum auf eine Funktion dieser Proteine in derselben Signaltransduktionskaskade hindeutet.

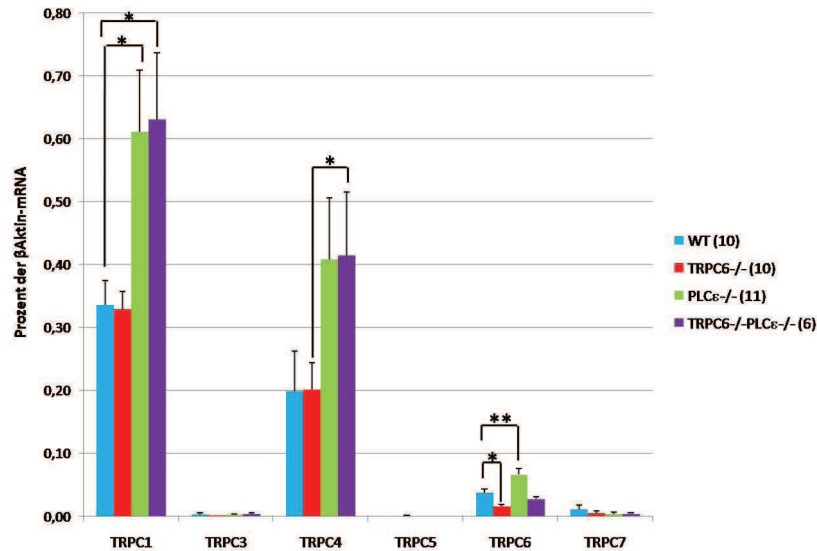


Abbildung 5.10: TRPC-Expression in Podozyten. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Klone für die Dreifachbestimmung an. Die TRPC5-Expression wurde nur in WT und TRPC6-defizienten Zellen und auch nur in 6 bzw. 7 Klonen analysiert. WT = Wildtyp Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ nach Anwendung einer ANOVA.

5.2.3 Quantifizierung der Transfektionseffizienz eines Markerplasmids in primären Podozyten

Die Transfektion von Plasmiden in Zellen ist eine Standardmethode für viele Zelltypen. Durch das Einbringen von DNA in die Zelle wird diese dazu veranlasst, das entsprechende Protein zu exprimieren, welches dann im Zusammenspiel mit anderen zellulären Proteinen untersucht werden kann.

In den primären Podozyten soll durch Transfektionen der TRPC6-Kanal mit verschiedenen Punktmutationen eingebracht werden, die von FSGS-Patienten bekannt sind (siehe Abbildung 3.11). Leider ist die Transfektion bei Podozyten außergewöhnlich schwierig. Zunächst wurde die Methode daher hier mit einem kleineren Plasmid etabliert, welches für das GFP(= green fluorescent protein = grün-fluoreszierendes Protein)-Protein als

5 Ergebnisse

Marker kodiert. Das Protein wird in der Quallenart *Aequorea victoria* exprimiert und fluoresziert bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 475 nm im grünen Bereich (509 nm). Durch Expression dieses Markerproteins können die erfolgreich transfizierten, grün leuchtenden Zellen leicht identifiziert und ausgezählt werden.

Polymer- und Lipotransfektionen sind für die Zelle sehr schonende Methoden der Transfektion. Das Transfektionsreagenz lagert sich bei diesen Methoden wie eine Hülle um die Plasmid DNA, was die Aufnahme in die Zelle erleichtert. Die Elektroporation dagegen macht die Zellmembran durch elektrische Impulse durchlässig. Diese Methode ist effizienter, jedoch sterben auch bis zu 50 % der Zellen im Verlauf der Elektroporation. Besonders schonend ist die virale Infektion mit rekombinanten Viren, da trotz hoher Effizienz die Zelle nicht beschädigt wird. Bei dieser Methode ist es jedoch notwendig, die DNA in einen viralen Vektor zu klonieren und rekombinante Viren zu produzieren. Um die Lentiviren replikationsinkompetent zu machen, werden bei der Produktion drei Plasmide verwendet. Ein Plasmid codiert für Verpackungsproteine, ein weiteres Plasmid hilft bei der Virus-DNA Replikation und das dritte Plasmid enthält das deletierte Virusgenom mit der zu exprimierenden cDNA des gewünschten Proteins [96]. Die Methode ist also relativ aufwendig.

Die Ergebnisse der verschiedenen Transfektionsmethoden sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. In die Podozyten konnte weder mit Polymer- noch mit Lipotransfektion DNA eingebracht werden. Mit verschiedenen Elektroporationsmethoden in zwei unterschiedlichen Elektroporatorapparaturen (Amaxa, NEON) konnte eine Effizienz von bis zu 25 % erreicht werden. Nur die virale Infektion führte zu einer erhöhten Effizienz von 70 %.

Methode	Art der Methode	Effizienz mit GFP Plasmid (ca. 3500bp) in Prozent
TransIT	Polymertransfektion	0
Lipofectamin2000	Lipofektion	0
PEI (Polyethylenimin)	Polymertransfektion	0
Amaxa	Elektroporation	25
NEON	Elektroporation	10
G5A-Viren	Virusinfektion	70

Tabelle 5.1: Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden. Das Amaxa-Gerät arbeitet mit einer Küvette, in der ein elektrisches Feld erzeugt wird. Im Neon-System hingegen wird die Elektroporation in einer Pipette durchgeführt. G5A-Viren sind rekombinante Lentiviren, die das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren.

5.2.4 Quantifizierung der Zellviabilität der Podozyten

Bei der Kultivierung der Podozyten verschiedener Genotypen waren unterschiedliche Wachstumsraten beobachtet worden. Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein Zellviabilitäts(WST)-Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6.7). Die Absorption ist proportional zu der Menge der metabolisch aktiven Zellen, ein hoher Wert zeigt also starke Viabilität an. Ich konnte zeigen, dass die TRPC6-defizienten Podozyten eine signifikant erhöhte Viabilität im Vergleich zu den WT und PLC ϵ -defizienten Zellen zeigen. Die Daten des WST-Assays zeigen, dass sich TRPC6-defiziente Zellen stärker vermehren, also insgesamt eine höhere Vitalität als die WT-Zellen und PLC ϵ -defizienten Zellen zeigen.

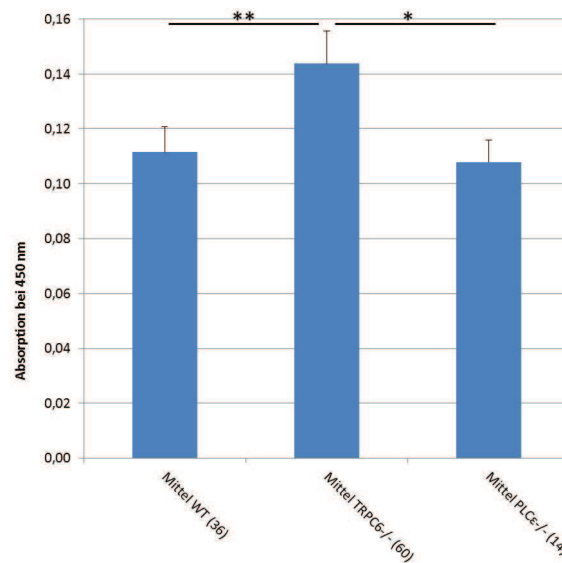


Abbildung 5.11: WST-Assay mit Podozyten der verschiedenen Genotypen. Hier sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen aufgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Messungen pro Genotyp sind in Klammern unter dem Diagramm aufgeführt. WT = Wildtypzellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ nach Anwendung einer ANOVA.

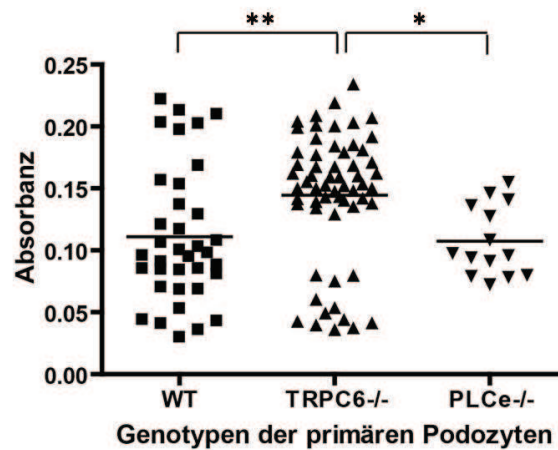


Abbildung 5.12: Verteilung der Datenpunkte und statistische Auswertung des WST-Assays mit einer ANOVA. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5.2.5 Quantifizierung von nekrotischen und apoptotischen Podozyten

Eine Überladung mit Ca^{2+} -Ionen durch die überaktiven TRPC6-Kanalmutanten, die in den FSGS-Patienten identifiziert wurden, kann auch zur Induktion einer Apoptose in den Podozyten führen. Dabei ist die Dephosphorylierung des Apoptose-Proteins BAD durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin ein möglicher Mechanismus [30]. Durch das Absterben funktioneller Podozyten wird die Stabilität der Schlitzmembran reduziert, was wiederum eine Proteinurie in den Patienten auslösen kann. Aus diesem Grund wurde die Ausbildung apoptotischer Podozyten vor und nach Applikation von Angiotensin II mit Hilfe verschiedener Apoptose-Assays untersucht.

Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), das in gesunden Zellen nur auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist. In apoptotischen Zellen wird es jedoch an die Außenseite der Plasmamembran verlagert und kann von dem extrazellulär applizierten Annexin V erkannt werden. Durch die Fluoreszenzmarkierung des Annexin V emittieren diese Zellen eine grüne Fluoreszenz. Um nekrotische Zellen mit zerstörten Membranen zu identifizieren, wird in einem weiteren Schritt durch Zugabe von Propidiumjodid die DNA des Zellkerns dieser Zellen angefärbt, was in apoptotischen Zellen nicht möglich ist. Eine typische Färbung der Podozyten wird in Abbildung 5.13 gezeigt. Mit dem Annexin V Assay werden alle Zellen leicht grün gefärbt, nur nekrotische Zellen sind stark gefärbt. Der Unterschied zwischen apoptotischen und gesunden Zellen ist damit nicht klar erkennbar und die Apoptoserate lässt sich nur ungenügend quantifizieren.

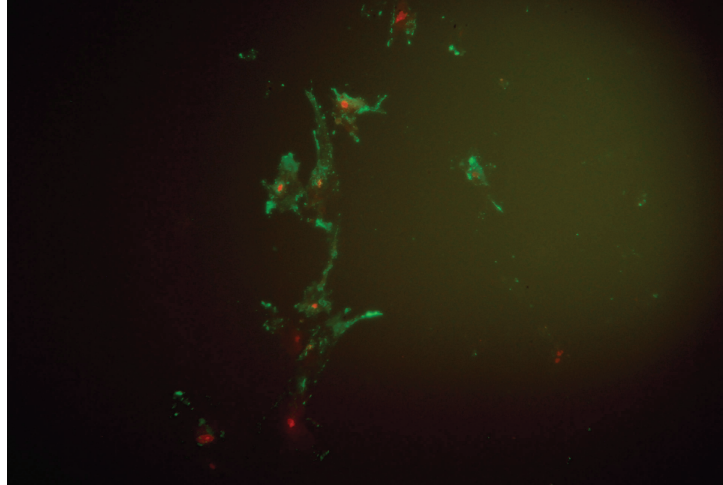


Abbildung 5.13: Analyse der Apoptoserate von WT-Podozyten mit dem Annexin V-Assay. Grün-fluoreszierende Zellen sind apoptotisch, aber nur wenn sie keinen rot-gefärbten Zellkern besitzen, da dies auf eine Zellnekrose hindeutet.

An dem Prozess der Apoptose sind sogenannte Caspasen beteiligt. Es ist möglich, die Aktivität dieser Caspasen mit dem CaspaseGlo-Kit zu quantifizieren (siehe Abschnitt 4.6.6.3). Der Nachweistest enthält ein Substrat, welches spezifisch durch die Caspasen 3 und 7 gespalten wird. Hierbei entsteht Luciferin, welches durch eine im Assay enthaltene Luciferase ein Lumineszenzsignal abgibt. Je mehr Zellen also in Apoptose gehen, desto stärker ist das Lumineszenzsignal. In Abbildung 5.14 ist ein signifikant deutlich erhöhtes Lumineszenzsignal der WT-Podozyten im Vergleich zu den TRPC6-defizienten Podozyten zu sehen.

5 Ergebnisse

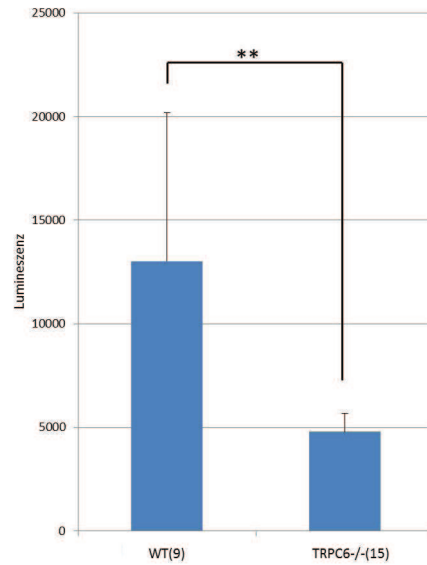


Abbildung 5.14: Analyse der Apoptoserate von WT-Podozyten im Vergleich zu TRPC6-defizienten Podozyten mit Hilfe eines Caspase-Assay. Die Anzahl der Messungen ist in der Grafik in Klammern dargestellt. WT = Wildtyp Zellen. ** = $p < 0,01$ nach Anwendung eines "student's t-tests".

Auch mit dem sogenannten TUNEL-Assay lassen sich apoptotische Zellen quantifizieren.

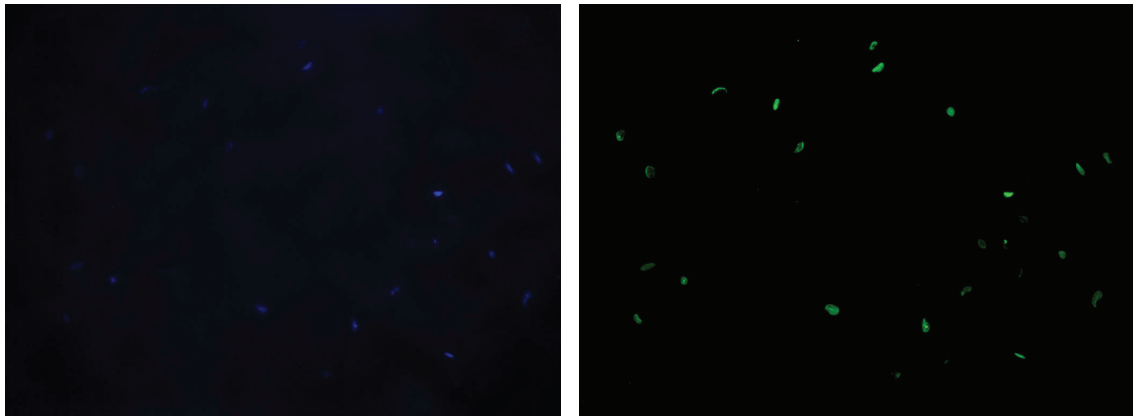


Abbildung 5.15: Apoptose in Podozyten gemessen mit dem sog. "TUNEL-Assay". Die Podozyten waren für die Positivkontrolle zuvor mit DNase behandelt worden. Links ist die Kernfärbung mit Hoechst 33342, rechts sind die apoptotischen Zellen zu sehen.

Während der Apoptose kommt es zu Strangbrüchen in der DNA. An den Bruchstellen entstehen freie OH-Gruppen. Das Enzym Tdt (= terminale Desoxyribonukleotidtransferase) ist in der Lage, Nukleotide an diese Stellen anzufügen. Im vorliegenden Nachweistest werden Uracilbasen angefügt, welche einen zusätzlichen Alkinrest besitzen. Dieser kann anschließend in einer Klick-Reaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Azid gekoppelt werden. Unter einem Fluoreszenzmikroskop können apoptotische Zellen dann mit einem grün leuchtenden Zellkern identifiziert werden.

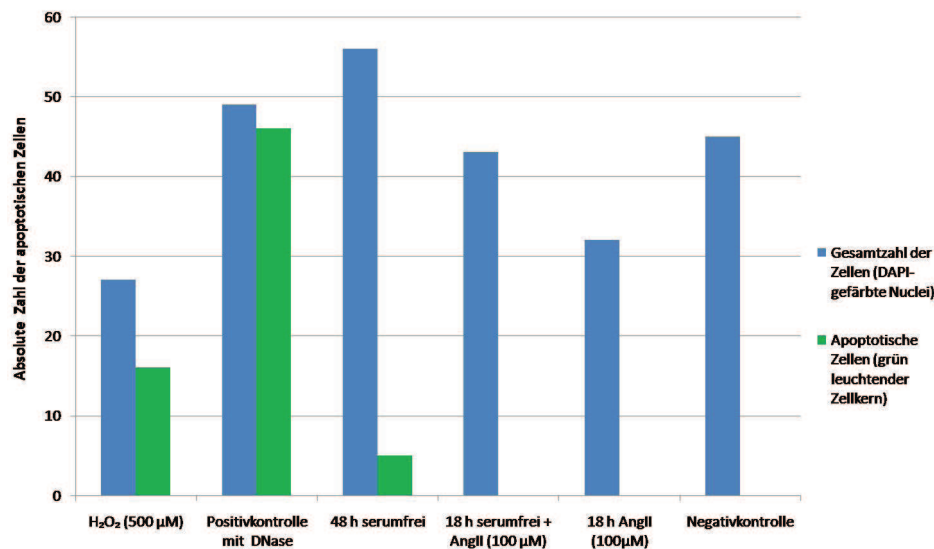


Abbildung 5.16: Quantifizierung der Apoptoserate mit Hilfe des sog "TUNEL-Assays". Es sind die absoluten apoptotischen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl angegeben.

WT-Podozyten wurden verschiedenen Behandlungen unterzogen und anschließend unter dem Mikroskop begutachtet. Wie in Abbildung 5.17 zu sehen, sind durch die Zerstörung der DNA durch DNase 94 % der Zellen positiv. Eine vorherige Inkubation mit Wasserstoffperoxid führt zu einer Apoptoserate von 59 % und durch den Entzug von Serum für 48 h gehen 9 % der Podozyten in Apoptose. Keinen Effekt dagegen hat ein Serumentzug für 18 h oder die Inkubation der Zellen mit 100 µM Angiotensin II (AngII). Es wurden auch vergleichend Wildtyp und TRPC6-defiziente Podozyten mit 100 µM

Angiotensin II (AngII) und 24 Stunden Serumentzug behandelt. In keinem Fall konnten allerdings apoptotische Zellen identifiziert werden. Insgesamt ist diese Methode also zu wenig sensitiv, um Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den Podozyten verschiedener Genotypen festzustellen.

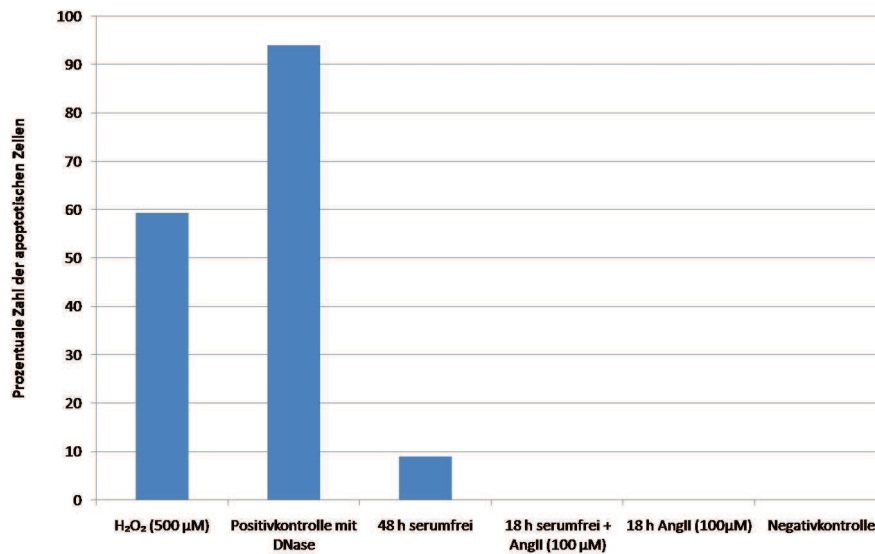


Abbildung 5.17: Gemessene Apoptoseraten eines WT-Podozytenklons (in %) mit Hilfe des TUNEL-Assay. Es sind die apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben.

5.2.6 Regulation der Calcium-Homöostase in Podozyten nach Rezeptorstimulation

Eine wichtige Funktion der Podozyten ist es, die Stabilität der Filtrationsmembran im Glomerulus zu gewährleisten, auch wenn große Drücke wie z. B. bei Patienten mit Bluthochdruck auf sie einwirken. Die Erhöhung des Blutdrucks ist meist an eine Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems gekoppelt, die zu einer Produktion des vasokonstriktorisches Hormons Angiotensin II führt. Angiotensin II kann auch bei Podozyten an die entsprechenden AT₁-Rezeptoren binden und Kationenkanäle aktivieren, um eine Stabilisierung der Filtrationsmembran zu induzieren.

Im Calcium Imaging ist es möglich, die Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration einer einzelnen Zelle zu beobachten. Wie in Abschnitt 4.6.3 beschrieben,

5 Ergebnisse

gelingt dies durch den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, dessen Exzitationsmaximum davon abhängig ist, ob er Calcium gebunden hat oder nicht.

Der durch Angiotensin II (AngII) aktivierte AT_1 -Rezeptor der Podozytenzellen aktiviert über $G_{q/11}$ -Proteine Phospholipasen, die wiederum durch die Produktion von Diacylglycerin direkt Kationenkanäle der TRPC3/6/7-Subfamilie in den Podozyten öffnen können. Interessanterweise zeigen die TRPC6- und $PLC\epsilon$ -defizienten Podozyten nur einen sehr geringen Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zu den genetisch unveränderten Wildtyp-Zellen. Beide Proteine sind daher essentiell für die Funktion der Podozyten an der Schlitzmembran. Dies ist auch ein deutlicher Hinweis darauf, dass unter den Isoenzymen der Phospholipasen-C die $PLC\epsilon$ hauptsächlich zur Produktion von DAG und damit zur Aktivierung der TRPC-Kanalfamilie beiträgt. Die Überexpression der TRPC1- und TRPC4-Kanäle (siehe Abb. 5.10) reicht also offensichtlich nicht aus, um das Fehlen des DAG-sensitiven TRPC6-Kanals zu kompensieren.

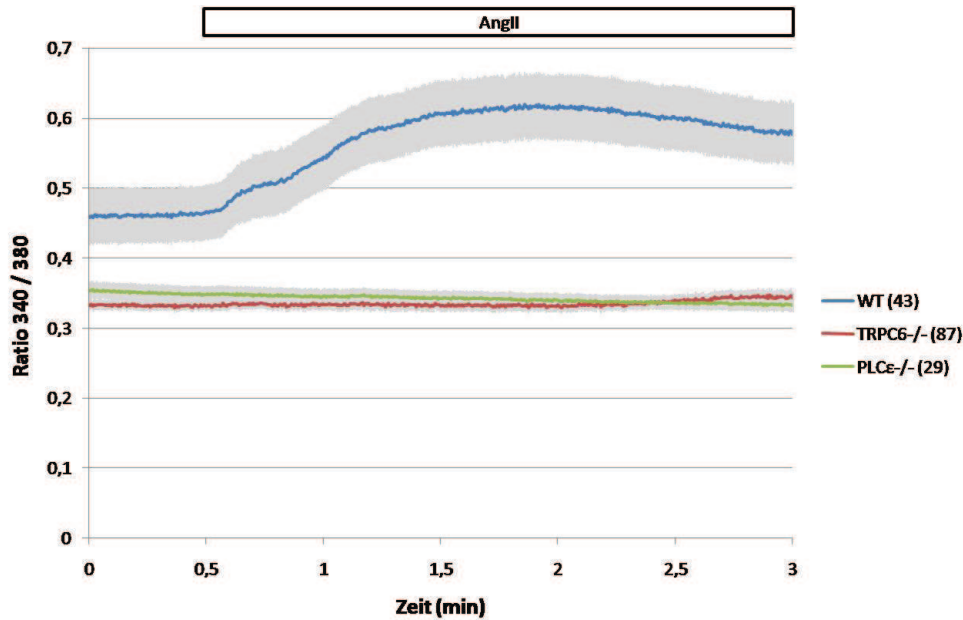


Abbildung 5.18: Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in primären Podozyten aus Wildtyp (WT)-, TRPC6-/- und $PLC\epsilon$ -/- Mäusen nach Applikation von 100 μ M Angiotensin II (AngII). Die Fluoreszenzemission des Ca^{2+} -Indikators Fura2 wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm gemessen. Der Quotient (ratio 340/380) ist proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.

5.2.7 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen PLC ϵ und TRPC6 durch Koimmunpräzipitation in HEK293-Zellen und in Podozyten

Aufgrund der bisherigen funktionellen Befunde stellte sich die Frage, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen TRPC6 und PLC ϵ in verschiedenen Zellsystemen existiert. In der Tat konnten TRPC6 und PLC ϵ aus Podozyten koimmunpräzipitiert werden (siehe Abbildung 5.19). Dabei wurde durch einen PLC ϵ -spezifischen Antikörper die Phospholipase C- ϵ spezifische Immunkomplexe mit Hilfe von Protein-A Sepharose immunpräzipitiert.

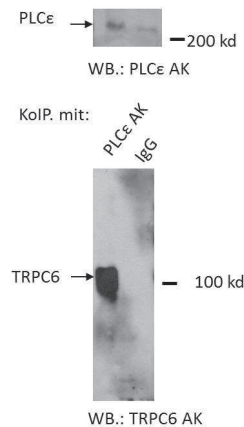


Abbildung 5.19: Koimmunpräzipitation von TRPC6 und PLC ϵ in primären Podozyten. Oben: Nachweis des Proteins im Lysat mit einem PLC ϵ -spezifischen Antikörper. Unten: Western Blot mit Immunpräzipitaten, die aus Zelllysaten mit dem PLC ϵ -spezifischen Antikörper gewonnen wurden. Zur Kontrolle ist eine Immunpräzipitation mit Immunglobulin G (IgG) gezeigt.

Durch eine Analyse der präzipitierten Immunkomplexe im Western Blot konnte der TRPC6-Kanal, fusioniert mit dem Hämagglutinin-Epitop, durch einen Hämagglutinin-spezifischen Antikörper in diesen Komplexen identifiziert werden. Eine direkte Interaktion zwischen TRPC6 und PLC ϵ wurde auf diese Weise sowohl in HEK293-Zellen (siehe Abbildung 5.20) als auch in Podozyten (siehe Abbildung 5.19) gezeigt. In HEK293-Zellen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es sich um eine PLC ϵ -spezifische Interaktion handelt, da keine Immunpräzipitation von PLC β 1 mit TRPC6 möglich war.

5 Ergebnisse

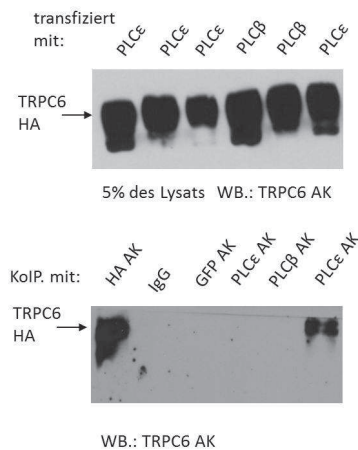


Abbildung 5.20: PLC ϵ lässt sich mit TRPC6 koimmunpräzipitieren. Oben: 5 % der eingesetzten Zelllysate von TRPC6-HA exprimierenden HEK293-Zellen, die mit unterschiedlichen cDNAs transfiziert wurden. Die Position des TRPC6-Kanalproteins, fusioniert mit dem Hämagglutinin-Epitop, ist durch Pfeile markiert. Unten: Western Blot mit Immunpräzipitaten, die aus Zelllysaten mit den angegebenen Antikörpern (KoIP. mit) gewonnen wurden. Das TRPC6-Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (TRPC6 AK) detektiert. HA AK = Hämagglutinin Antikörper, IgG = Immunglobulin G, GFP AK = Antikörper gegen das grün-fluoreszierende Protein

5.2.8 Vergleich der PLC ϵ -WT mit einer PLC ϵ -Patientenmutation in HEK293-Zellen

Nachdem die direkte Interaktion zwischen TRPC6 und PLC ϵ nachgewiesen war, sollte nun auch eine der PLC ϵ -Mutationen, die in den Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) identifiziert worden waren (siehe Abbildung 3.12), näher funktionell untersucht werden. Mit Hilfe sog. Mangan-Quench Experimente kann der Ioneneinstrom in HEK293-Zellen untersucht werden, in denen PLC ϵ oder die Patientenmutation der PLC ϵ H1144L heterolog exprimiert werden. TRPC-Kanäle in HEK293-Zellen lassen auch andere Ionen als Ca²⁺, z. B. Mn²⁺, permeieren. Während durch Ca²⁺-Ionen die Fura-2 Emission durch Exzitation bei 360 nm nicht verändert wird, wird durch Mn²⁺ die Fura-2-Emission vermindert. In diesem Versuch werden nur Mn²⁺-Ionen, die von außen durch geöffnete TRPC-Kanäle strömen, quantifiziert. Ein eventueller TRPC-unabhängiger Ca²⁺-Austrom aus den internen Speichern wird nicht berücksichtigt.

Die Fluoreszenzemission der Zellen, in denen PLC ϵ exprimiert wurde, sinkt nach Zugabe von 100 μ M Carbachol (CCh) stark ab (siehe Abbildung 5.21), was auf einen Io-

neneinstrom durch TRPC-Kanäle in die Zelle schließen lässt. Die Zellen, die die mutierte PLC ϵ (H1144L) exprimierten, zeigen hingegen kaum eine Änderung nach Zugabe des Agonisten. Das permanente leichte Abfallen des Signals ist durch das Ausbleichen des Farbstoffs bedingt. Das Fehlen einer funktionsfähigen PLC ϵ reduziert also den TRPC-typischen Ioneneinstrom in HEK293-Zellen nach Rezeptorstimulation durch eine Applikation von Carbachol (CCh).

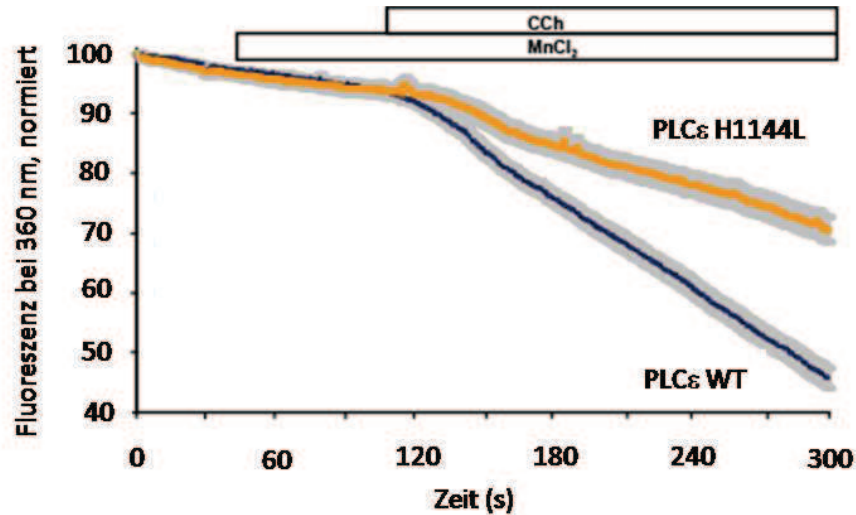


Abbildung 5.21: Manganionen-Einstrom in HEK293-Zellen nach Zugabe von 1 mM MnCl_2 und 100 μM Carbachol (CCh). Untersucht wurden Zellen, die die PLC ϵ (PLC ϵ WT) oder eine mutierte Form der PLC ϵ (PLC ϵ H1144L) exprimierten. MnCl_2 : Mangandichlorid.

5.2.9 Untersuchungen zur Aufklärung der Signaltransduktionskaskade von der Bindung von Angiotensin II an den AT $_1$ -Rezeptor zur Aktivierung des TRPC6-Kanals

In den bisher aufgeführten Studien wurden Daten zur Aktivierung des TRPC6-Kanals durch die PLC ϵ erhoben. Wie aber wird die PLC ϵ aktiviert? Da inaktivierende Mutationen der Ras Bindungsdomänen RA1 und RA2 keine Auswirkungen auf die PLC ϵ -Aktivierung hatten, konnte dieser Aktivierungsmechanismus ausgeschlossen werden. Die PLC ϵ kann aber auch durch Rho-Proteine direkt aktiviert werden [12]. Nach Applikation von Rho-Toxin konnte keine durch Angiotensin II induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms in primären Podozyten mehr festgestellt werden (siehe Abbildung 5.22), so dass eine Rho-Aktivierung der PLC ϵ sehr wahrscheinlich ist.

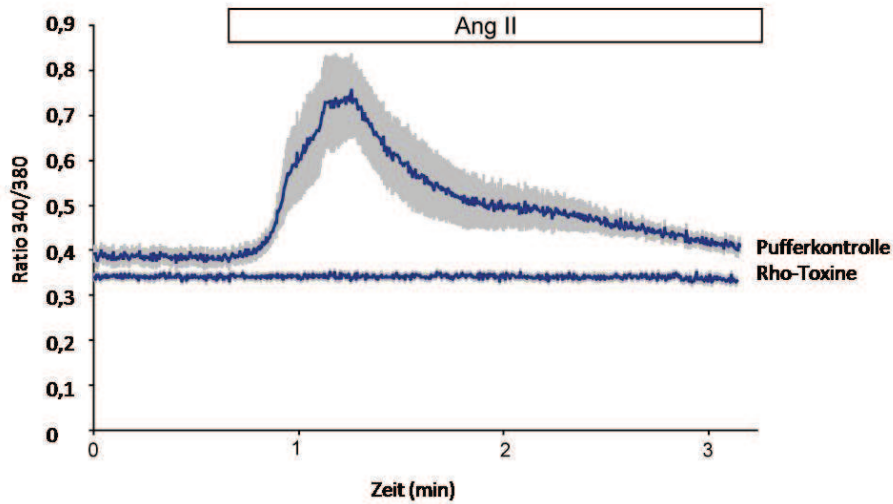


Abbildung 5.22: Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in primären Podozyten, präinkubiert mit Rho-Toxinen (CIN-C3 + C2IIa) oder Kontrollpuffer nach Applikation von 100 μM AngII. Die Fluoreszenzemission des Ca^{2+} -Indikators Fura2 wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm gemessen. Der Quotient (ratio 340/380) ist proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

In einem weiteren Schritt wurden die an der Signaltransduktionskaskade beteiligten G-Proteine mit Hilfe von sog. Mn^{2+} -Quench Experimenten in HEK293-Zellen, die TRPC6 stabil exprimierten, identifiziert. In diesen Experimenten vermindert der TRPC6-abhängige Mn^{2+} -Einstrom die Fura2-Fluoreszenz in den mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen. Interessanterweise konnte nur die „down-Regulation“ von $\text{G}_{\alpha 12/13}$ -Untereinheiten durch spezifische small hairpin RNAs (shRNAs) den normalen Mn^{2+} -Einstrom reduzieren, was auf eine Beteiligung dieser Untereinheiten hindeutet (siehe Abbildung 5.23).

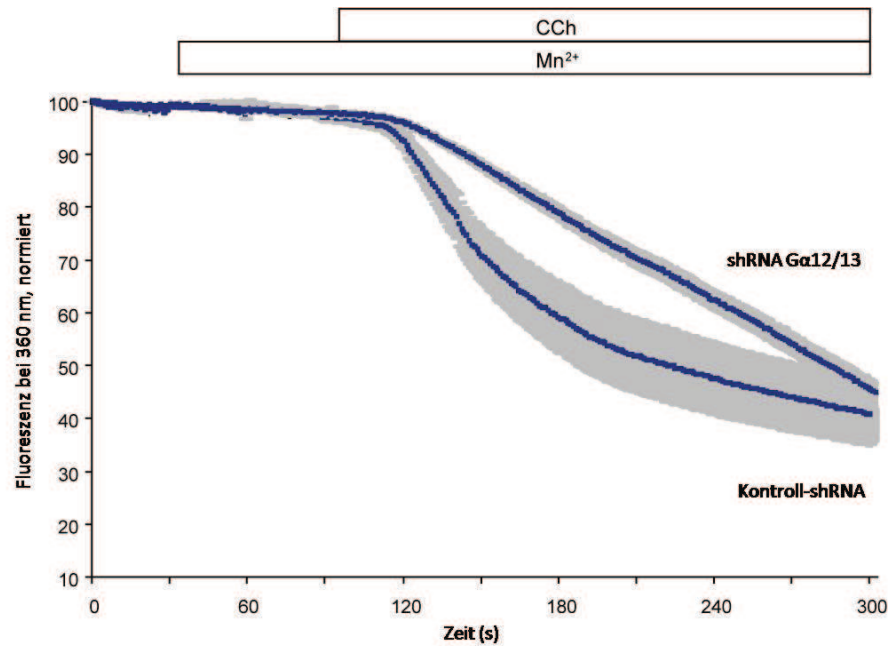


Abbildung 5.23: Messung des intrazellulären Mn^{2+} -Einstroms in HEK293-Zellen, die den TRPC6-Kanal stabil exprimieren, nach Expression einer shRNA gegen $\text{G}_{\alpha 12/13}$ oder einer Kontroll shRNA. Die Rezeptoraktivierung erfolgte mit 100 μM Carbachol (CCh) nach der Zugabe von 1 mM MnCl_2 . Die Inhibition der Fluoreszenzemission des Ca^{2+} -Indikators Fura2 durch Mn^{2+} -Ionen, wird nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 360 nm gemessen. Da TRPC6-Kanäle Kationen wie Mn^{2+} unspezifisch permeieren lassen, sind die gemessenen Werte proportional zur TRPC6-Aktivität in den Zellen.

5.2.10 Analyse der kontraktilen Funktionen durch Untersuchungen am Aktinzytoskelett des Podozyten

Podozyten sind im Glomerulus nicht nur für die Stabilität der Schlitzmembran verantwortlich, sondern können auch durch Änderung der Aktinstruktur und des assoziierten Nephrens die Porengröße direkt regulieren. Um Veränderungen des Zytoskeletts direkt sichtbar zu machen, kann das Pilzgift Phalloidin genutzt werden, das direkt an das polymerisierte F-Actin binden kann und dessen Depolymerisation verhindert. Das Phalloidin wird an Fluoreszenzmoleküle gekoppelt, so dass polymerisierte Aktinfasern der Podozyten unter dem konfokalen Lasermikroskop direkt dargestellt werden können. Durch

5 Ergebnisse

Auswertung der absoluten Graustufen der Aktinbilder kann eine Quantifizierung der Aktinpolymerisation vor und nach Applikation von Angiotensin II erfolgen.

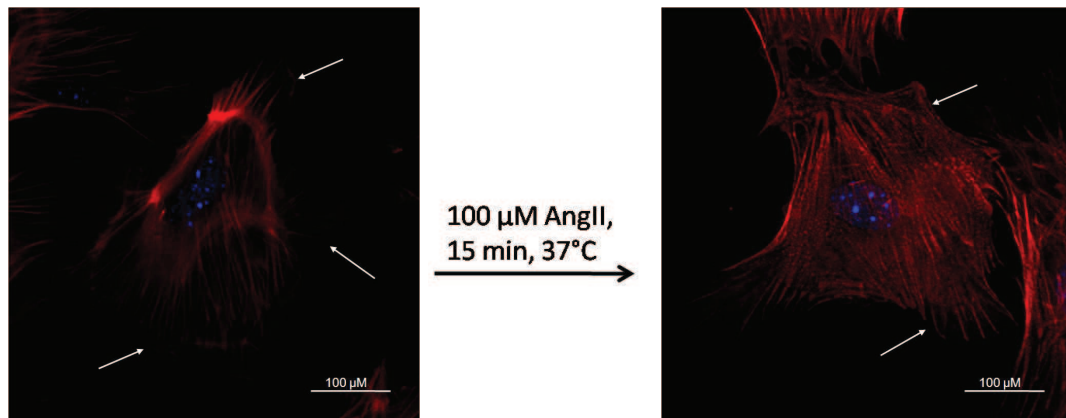


Abbildung 5.24: Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von WT-Mäusen nach Inkubation mit 100 μM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.

In den Wildtyp-Podozyten ist eine deutliche Zunahme der polymerisierten Aktin-Fasern nach Zugabe von Angiotensin II sichtbar. Vor allem in der Nähe der Zellmembran sind vor der Stimulation nur wenige Aktin-Fasern erkennbar (Pfeile in Abb. 5.24). Insgesamt scheinen die Podozyten nach Gabe von Angiotensin II eine größere und stabilere Zelloberfläche zu besitzen, so dass eine höhere Stabilität der Blut-Harn-Schranke bei Patienten mit Bluthochdruck erreicht werden kann.

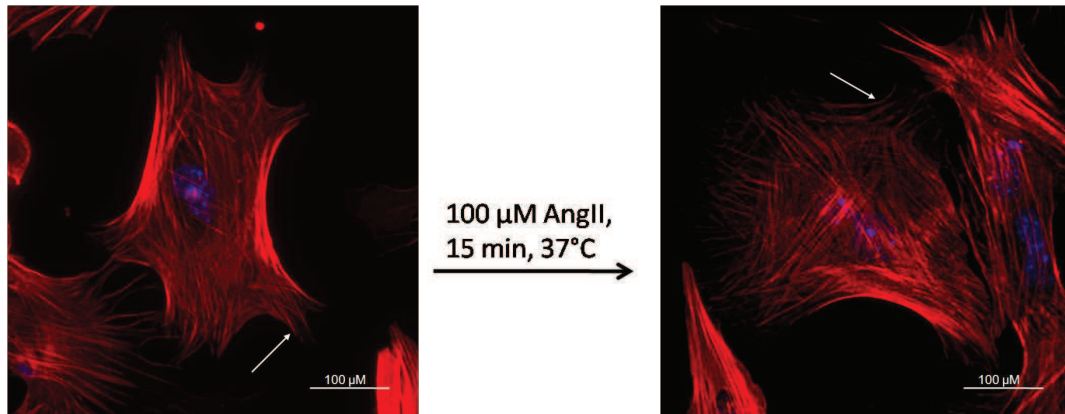


Abbildung 5.25: Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 µM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.

Die TRPC6-defizienten Zellen haben bereits vor Stimulation viel stärker ausgeprägte F-Aktinfasern, die sich durch Gabe von Angiotensin II nur noch unwesentlich verstärken lassen (siehe Abbildung 5.25).

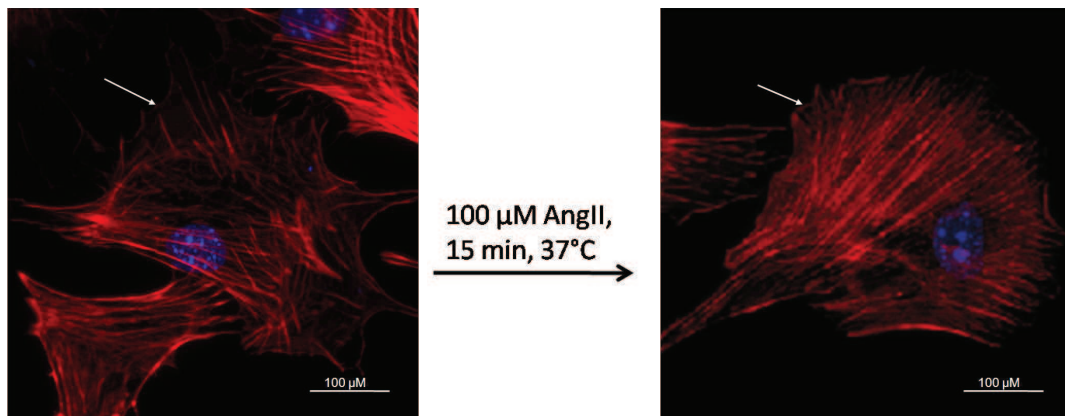


Abbildung 5.26: Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von PLCε-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 µM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.

5 Ergebnisse

Bei PLC ϵ -defizienten Podozyten ist ähnlich wie bei WT-Zellen ein starker Anstieg der F-Aktin Polymerisation nach Zugabe von Angiotensin II zu beobachten (siehe Abbildung 5.26).

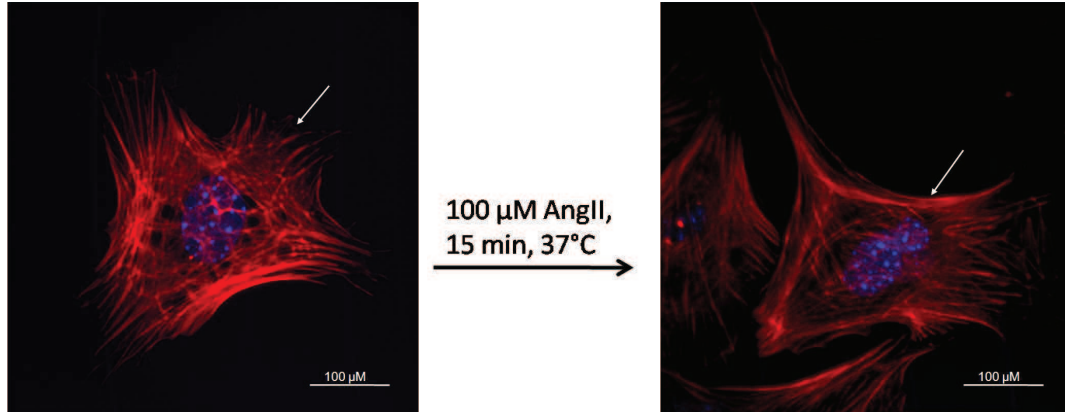


Abbildung 5.27: Änderung in der Aktinpolymerisation in primären Podozyten von PLC ϵ - und TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 µM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden. Die weißen Pfeile markieren die Ränder der Zelle.

Die PLC ϵ /TRPC6-defizienten Podozyten zeigen ebenfalls einen Anstieg der Aktinpolymerisation, diese ist aber im Gegensatz zu den Wildtyp- und den PLC ϵ -defizienten Zellen auch vor der Inkubation schon stark ausgeprägt (siehe Abbildung 5.27).

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurden pro Genotyp und Behandlung jeweils 53 Zellen durch Bestimmung der relativen Graustufen mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ ausgewertet. Die Daten sind in Abbildung 5.28 dargestellt.

5 Ergebnisse

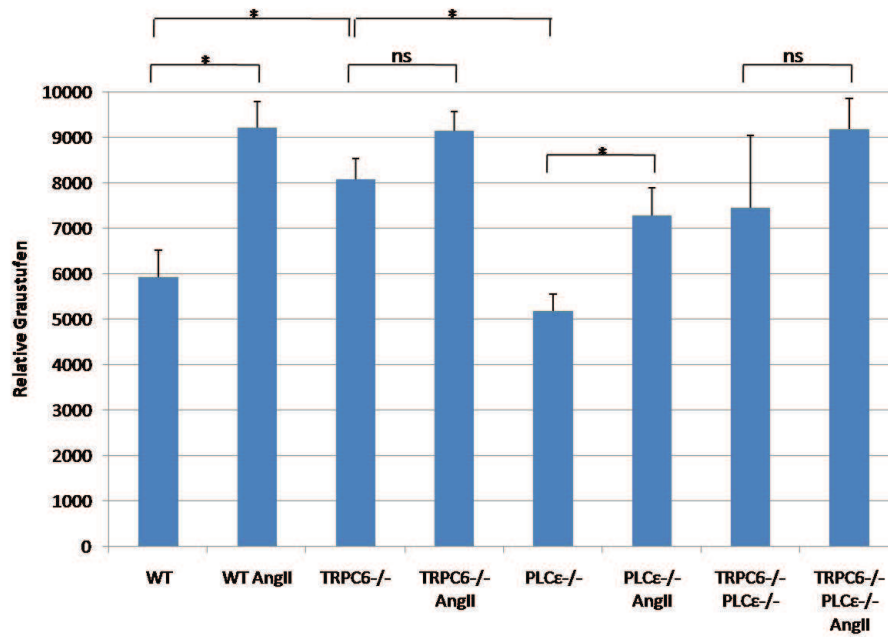


Abbildung 5.28: Analyse der F-Aktinpolymerisation in Podozyten unterschiedlicher Genotypen vor und nach Inkubation mit Angiotensin II (AngII) (100 μ M). Aufgetragen sind die Mittelwerte der relativen Graustufen. Es wurden jeweils 53 Zellen vermessen. * = $p < 0,05$ nach Anwendung einer ANOVA.

Eine signifikante Erhöhung der polymerisierten F-Aktin Fasern durch Zugabe von Angiotensin II konnte sowohl bei den WT- als auch bei den PLC ϵ -defizienten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.28). Die TRPC6- und TRPC6/PLC ϵ -defizienten Podozyten hingegen zeigten schon vor der Inkubation mit Angiotensin II eine starke Aktinpolymerisation und konnten diese nach Zugabe von Angiotensin II nicht mehr wesentlich steigern.

Der Grad der Aktinpolymerisation in den Podozyten verschiedener Genotypen war aber besonders in den TRPC6-defizienten und PLC ϵ /TRPC6-defizienten Zellen erhöht (siehe Tabelle 5.2).

WT	TRPC6-/-	PLC ϵ -/-	TRPC6-/- PLC ϵ -/-
100 %	136 %	87 %	126 %

Tabelle 5.2: Relative Graustufen von unbehandelten Podozyten im Vergleich zu Wildtyp Podozyten. Die Unterschiede sind nur bei TRPC6-defizienten Zellen signifikant.

5 Ergebnisse

Für die bisherigen Messungen wurden Zellen verwendet, welche nicht konfluent sind. Beobachtet man nun konfluente Zellen, zeigt sich erneut, dass die Bildung von Aktin-Stressfibern und die Größe der Zellen durch Gabe von Angiotensin II stark zunimmt (siehe Abbildung 5.29 und 5.30).

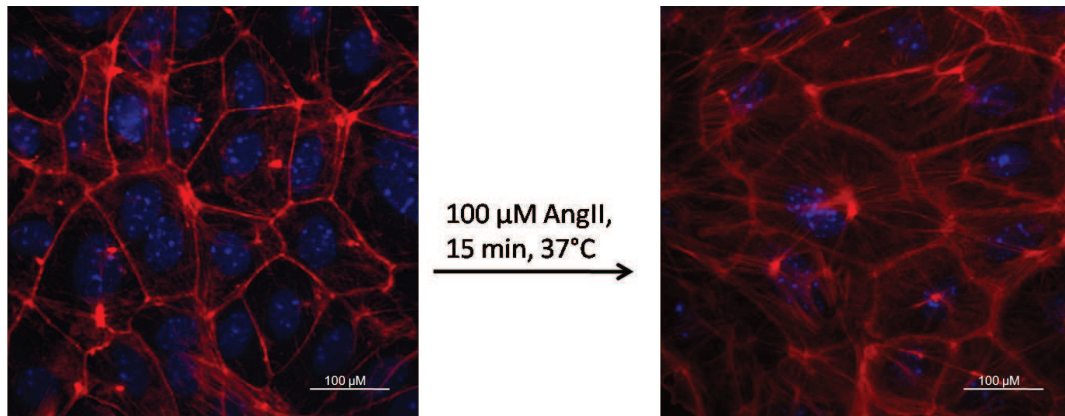


Abbildung 5.29: Änderung in der Aktinpolymerisation in konfluenten primären Podozyten von WT-Mäusen nach Inkubation mit 100 μM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden.

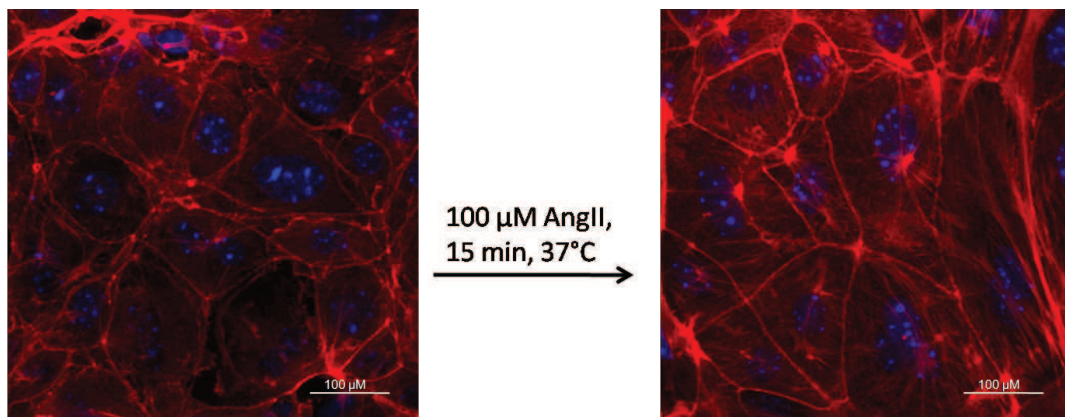


Abbildung 5.30: Änderung in der Aktinpolymerisation in konfluenten primären Podozyten von TRPC6-defizienten-Mäusen nach Inkubation mit 100 μM Angiotensin II. Die Zellen sind mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt worden.

5 *Ergebnisse*

Eine bereits erhöhte Aktinpolymerisation und Zunahme der Zellgröße vor der Gabe von Angiotensin II ist hier ebenfalls in den konfluenten TRPC6-defizienten Podozyten zu erkennen (siehe Abb. 5.30).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion zweier klassischer TRP-Kanäle, TRPC1 und TRPC6 mit Hilfe von gendefizienten Mausmodellen im Vergleich zu nicht modifizierten Tieren untersucht. Dabei erwies sich insbesondere die TRPC1-Funktion als zu komplex für diese Arbeit, so dass die TRPC6-Funktion in Podozyten der Niere im Verlauf der Arbeit immer mehr in den Vordergrund rückte.

6.1 Analyse der TRPC1-Prozessierung und -Funktion

6.1.1 Analyse der TRPC1-Expression und -Prozessierung

Wie in der Einleitung bereits erläutert, ist die TRPC1-Funktion im Säugerorganismus noch nicht geklärt und immer wieder Anlass für Spekulationen. Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass distinkte TRPC1-Ströme nach heterologer Expression des Kanals gemessen werden können (z. B. [97]), während andere Gruppen die regulative Rolle von TRPC1 auf heteromere Kanalkomplexe betonen (z. B. [34]). Zur Untersuchung der Prozessierung und Funktion des TRPC1-Kanals sollte zuerst das murine Protein heterolog exprimiert werden. Die entsprechende murine TRPC1-cDNA war zwar bereits kloniert und veröffentlicht worden [98], stand aber nach Angaben der entsprechenden Arbeitsgruppe nicht mehr zur Verfügung. Aus diesem Grund musste die TRPC1-cDNA neu aus Maushirn-mRNA von Wildtyp-Mäusen kloniert werden. Es gelang, die gesamte TRPC1-cDNA-Sequenz in zwei überlappenden Sequenzen zu isolieren. Diese konnten dann zusammengesetzt werden (siehe Abbildung 5.1). Um den murinen TRPC1-Kanal in späteren Versuchen leichter identifizieren zu können, wurde dieser noch mit dem Hämagglutinin (HA)-Epitop markiert. Das Epitop wurde sowohl carboxyterminal als auch aminoterminal an das TRPC1-Protein fusioniert. In früheren Arbeiten konnte für den TRPC6-Kanal bereits gezeigt werden, dass diese Fusion die Kanalaktivität nicht beeinflusst [45]. Die entsprechenden Proteine konnten heterolog in HEK293-Zellen exprimiert und mit einem mTRPC1-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.3). Hierbei fiel auf, dass die Bande des mTRPC1-Proteins nicht, wie theoretisch aus der Aminosäuresequenz erwartet, etwa 100 kDa groß ist, sondern im Western Blot bei etwa 80 kDa detektiert

wurde. Dieses Phänomen wurde auch beim humanen TRPC1-Protein in verschiedenen Veröffentlichungen [23, 99] nachgewiesen. Die Vermutung liegt nahe, dass nach der Expression das mTRPC1-Protein durch Proteolyse verkürzt wird. Diese Verkürzung kann am Aminoterminus oder am Carboxyterminus des Proteins auftreten.

Um dies näher zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen TRPC1-Proteine mit dem fusionierten Hämagglutinin-Epitop heterolog exprimiert und mit dem HA-spezifischen Antiserum im Western Blot identifiziert (siehe Abbildung 5.3 rechts). Das TRPC1-Protein mit dem am C-Terminus befindlichen HA-Epitop war zweifelsfrei nachzuweisen. Einen Sonderfall stellte jedoch das TRPC1-Protein mit dem aminoterminalen HA-Epitop dar. Es war nicht möglich, dieses Protein mit dem HA-Antikörper nachzuweisen, obwohl die Proteinbande mit dem TRPC1-spezifischen Antikörper identifiziert werden konnte (siehe Abbildung 5.3 links). Offenbar wird also der TRPC1-Kanal um ein 20 kDa großes Fragment durch Proteasen verkürzt oder ein internes Startcodon (ATG) zum Beispiel an Position 174 der cDNA zur Initiation der Proteintranslation benutzt, so dass ein verkürztes Protein translatiert wird. Im Western Blot mit dem HA-spezifischen Antiserum ist keine Bande bei ca. 20 kDa zu erkennen, wodurch die zweite Theorie gestützt wird. Diese Bande wäre jedoch auch nicht zu erkennen, wenn der abgetrennte Teil weiter fragmentiert wird.

Um die Hypothese der frühen Proteolyse des TRPC1-Proteins zu überprüfen, wurden Proteinlysate von HEK293-Zellen, die mit den verschiedenen mTRPC1-Plasmiden transfiziert worden waren, mit und ohne Proteaseinhibitoren abgeerntet. Anschließend wurden die mTRPC1- und die mTRPC1-HA-Expression im Western Blot untersucht. Bei dem aminoterminalen HA-mTRPC1 konnte nach der Zugabe von Trypsin-Inhibitor und Protease-Inhibitor keine Zunahme der erwarteten mTRPC1-HA Bande beobachtet werden (siehe Abbildung 5.5). Die schwach sichtbaren kleineren Banden wurden auch in Proteinlysaten mit dem nicht-fusionierten TRPC1-Protein erkannt und sind deswegen wahrscheinlich unspezifisch.

Durch partiellen Trypsinverdau des TRPC1-Proteins mit geringen Mengen der Protease Trypsin war es nicht möglich, einzelne Trypsinspaltungsstellen im Gesamtprotein zu identifizieren. Wahrscheinlich kann die Protease sehr viele Spaltstellen nutzen, was zu einer schnellen und vollständigen Proteolyse führt (siehe Abbildung 5.6).

Die verwendeten Trypsin-Konzentrationen stammen aus einer Veröffentlichung einer anderen Arbeitsgruppe, die Trypsinspaltstellen in der PLC β 2 untersucht hat [95].

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass im Vergleich zum theoretisch errechneten Molekulargewicht von ca. 100 kDa eine verkürzte Version des TRPC1-Proteins (ca. 80 kD) im heterologen Expressionssystem identifiziert werden kann. Ob dieses Phä-

nomen die Folge einer alternativen Initiation der Proteintranslation ist oder ob eine posttranslationale Proteolyse stattfindet, bleibt vorerst offen. Auch die Frage, inwieweit die verkürzte Expression die Funktion des TRPC1-Proteins beeinflusst, kann an dieser Stelle leider nicht beantwortet werden.

Zur weiteren Analyse des murinen TRPC1-Proteins sollte dessen Translokation zur Plasmamembran mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben untersucht werden. Durch Western Blot Analyse kann dann geprüft werden, ob das vermutete Protein an der Zelloberfläche gewesen ist oder nicht.

Da bekannt ist, dass der TRPC6-Kanal im Gegensatz zum TRPC1-Kanal als Tetramer an der Plasmamembran lokalisiert ist [23], sollte dieser als Positivkontrolle dienen. Beide Proteine wurden mit dem HA-Epitop fusioniert, wodurch ein Nachweis auf einem Western Blot mit einem sehr spezifischen HA-Antikörper möglich ist. Trotz zahlreicher Versuche und verschiedenen Versuchsvorschriften ist es nicht gelungen das TRPC6- oder TRPC1-Protein durch eine Oberflächenbiotinylierung nachzuweisen. Hierfür sind zwei Ursachen denkbar. Zum einen könnte die zu geringe Spezifität der Antikörper ein Grund sein, warum sich die publizierte Methode nicht auf die Oberflächenexpression des TRPC1-Kanals übertragen lässt. Eine andere Möglichkeit ist, dass der TRPC6-Kanal zwar an der Oberfläche exprimiert wird, jedoch durch die doppelte Glykosylierung des Proteins [45] eine effektive Biotinylierung nicht möglich ist.

6.1.2 Analyse der TRPC1-Funktion im murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Bereits während der vorangegangenen Diplomarbeit [100] wurden primäre murine embryonale Fibroblasten (= MEF) aus TRPC1-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und initial charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit stand vor allem die Vitalität sowie die Migration und Proliferation dieser Zellen in sogenannten Wundheilungsexperimenten im Vordergrund. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass TRPC1-defiziente Nieren-Epithelzellen Defekte in der Migration aufweisen [101]. In dieser Publikation wurde mit der stabilen Zelllinie MDCK-2 (= Madin-Darby canine kidney cells) gearbeitet, in der durch eine si-RNA der TRPC1-Kanal herunterreguliert wurde. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die TRPC1-defizienten Zellen ihre Polarität verloren und nicht mehr in der Lage waren gerichtet zu migrieren. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass das TRPC1-Protein für die Proliferation von glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie verantwortlich ist [102].

Um die Vitalität der Zellen zu quantifizieren, wurde ein WST-Assay mit den Zellen durchgeführt. Überraschenderweise konnte eine signifikante Erhöhung der Zellviabilität

der TRPC1-defizienten Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 5.7). Es konnte gezeigt werden, dass die TRPC1-defizienten Zellen also auch stärker proliferieren als die WT-Zellen. Hierzu wurde bereits in der Diplomarbeit gezeigt, dass die TRPC1-defiziente Maus insgesamt größer ist [100], was ebenfalls auf eine erhöhte Proliferationsrate der TRPC1-/- Zellen hinweist.

Diese Ergebnisse sollten in einem Wundheilungsexperiment überprüft werden, in dem Proliferation und Migration der Zellen in eine zellfreie Fläche beobachtet werden kann. Mit Hilfe des Electrical Cell Impedance Sensing (ECIS) Systems kann die Neubesiedlung der Fläche über den Anstieg des Widerstands beobachtet werden (siehe Abbildung 5.8). Allerdings zeigten in diesem Experiment die WT-Zellen eine deutlich effektivere Proliferation und Migration, was den gemessenen Widerstand etwa 3,5 mal so schnell wie bei den TRPC1-defizienten Zellen erhöhte. So scheint die gemessene höhere Vitalität also nicht mit einer erhöhten Proliferations- oder Migrationsrate zu korrelieren. Interessanterweise konnte auch eine andere Arbeitsgruppe eine gestörte Migration renaler Epithelzellen des Hundes und eine gestörte Chemotaxis von MDCK-Zellen nach Herunterregulation des TRPC1-Kanals mit spezifischen siRNAs beobachten [101]. Diese interessanten, aber komplexen Veränderungen der Zellfunktion in TRPC1-defizienten Mäusen sollen in Zukunft weiter in Kollaboration mit dieser Arbeitsgruppe untersucht werden.

6.2 TRPC6-PLC ϵ -Interaktion in Podozyten der Niere

Als Modellzellen für die Untersuchungen am TRPC6-Kanal dienten primäre Podozyten von Mäusen, die TRPC6-, PLC ϵ - oder TRPC6- und PLC ϵ -defizient waren im Vergleich zu WT-Tieren. Diese Zellen, die immer frisch aus Mausedembryonen gewonnen wurden, sind als native Podozyten für die gezeigten Versuche deutlich besser geeignet als die immortalisierte, induzierbare Podozyten-Zelllinie, die in vielen Veröffentlichungen untersucht wurde, aber teilweise weder Podocin noch den TRPC6-Kanal exprimiert. In transfizierten HEK293-Zellen wurden Proteine der Signaltransduktionskaskade des TRPC6 weiter untersucht.

6.2.1 Untersuchungen zur TRPC6- und PLC ϵ -Funktion in primär isolierten Podozyten und HEK293-Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden zahlreiche TRPC6-Mutationen in Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose identifiziert [2, 1, 3, 65, 68, 69, 70]. Die Krankheit geht mit einer Proteinurie einher, weshalb von einer Fehlfunktion der Blutharn Schranke ausgegangen werden kann. Ein wichtiger Bestandteil dieser Schranke sind

die sogenannten Podozyten, welche sowohl mechanosensitiv sind als auch durch Bindung von Agonisten an ihre Rezeptoren (z. B. dem Angiotensin Rezeptor) aktiviert werden können. Interessanterweise exprimieren diese Patienten-Podozyten einen mutierten, überaktivierten TRPC6-Kanal. Bisher ist die Rolle des TRPC6-Proteins im Podozyten völlig unklar und auch die TRPC6-Mutationen wurden noch nicht in primären Podozyten *in vitro* exprimiert. Etwas später wurden auch Mutationen in der Phospholipase C- ϵ in Patienten mit ähnlichen Symptomen entdeckt [3, 103]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion beider Proteine in primär isolierten Podozyten untersucht.

Hierbei wurde nach einer Siebmethode nach Rastaldi [82] vorgegangen. Zur Kontrolle, ob es sich tatsächlich um Podozyten handelt, wurde in diesen in einer immunhistologischen Färbung der Podozytenmarker Podocin angefärbt (siehe Abbildung 5.9). Podocin befindet sich an den Fußfortsätzen der Podozyten, daher wird ein Podocin-Antikörper in der Literatur häufig verwendet, um in Gewebeschnitten der Niere die Podozyten sichtbar zu machen (beispielsweise in [104]).

Zunächst wurden daher die TRPC-Genexpression in den primären Podozyten der verschiedenen Genotypen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Podozyten nahezu kein TRPC3 und TRPC5 und nur geringe Mengen TRPC7 exprimieren. Es ließen sich jedoch größere Mengen TRPC1- und TRPC4-mRNA und je nach Genotyp auch TRPC6-mRNA nachweisen. Obwohl den TRPC6-defizienten Mäusen das Exon 7 des TRPC6-Gens fehlt, wird noch TRPC6-mRNA exprimiert, auch wenn das TRPC6-Protein in den Mäusen nicht produziert wird [79]. In PLC ϵ - und TRPC6/PLC ϵ -defizienten Podozyten kann eine kompensatorisch deutlich vermehrte mRNA Expression des TRPC1- und TRPC4-Proteins nachgewiesen werden. In der Podozytenzelllinie [105] hingegen konnte mRNA für die TRPC1-, TRPC2-, TRPC5- und TRPC6-Kanäle, aber keine mRNA für den TRPC4-Kanal detektiert werden. Andere Veröffentlichungen zeigen eine TRPC3 [106] und TRPC5-mRNA-Expression [107] in der gleichen Zelllinie, die in den vorliegenden Experimenten in den primären Podozyten nicht nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchungen einer vorangegangenen Doktorarbeit in dieser Zelllinie zeigten nach Temperaturinduktion lediglich eine TRPC1 Expression [108]. Obwohl es sich um eine stabile Zelllinie handelt, scheint die Genexpression nach Induktion der Redifferenzierung zu Podozyten also nicht einheitlich zu sein.

TRPC1- und TRPC4-Proteine, deren Expression in den PLC ϵ -defizienten Podozyten kompensatorisch erhöht waren, sind in der Lage, heteromere Kanäle zu bilden [34], welche wahrscheinlich den reduzierten Calciumeinstrom über andere Mechanismen ausgleichen könnten.

In ähnlicher Weise konnten in glatten Muskelzellen stark erhöhte TRPC3-Level in TRPC6-defizienten Zellen auf mRNA-Ebene beschrieben werden [79]. Bei Versuchen zur Kontraktilität isolierter Aortenringe führte dies im Gegensatz zur Erwartung zu einer Erhöhung und nicht zu einer Abschwächung der Kontraktilität, was durch das Ausbilden von TRPC3-Homotetrameren anstelle der sonst vorhandenen TRPC6/TRPC3-Heterotetramere erklärt werden kann [79]. Ein ähnliches Phänomen kann in den TRPC6-defizienten Podozyten durch meine Untersuchungen ausgeschlossen werden, da TRPC3 praktisch nicht exprimiert wird.

Für viele Analysen ist es wünschenswert, Proteine (z. B. die mutierten Kanäle aus den Patienten) in Podozyten heterolog zu exprimieren. Dazu müssen Expressionsplasmide in die Podozytenzellen transfiziert werden. Mit den gängigen publizierten Transfektionsmethoden [1, 109, 110] konnte in der vorliegenden Arbeit keine ausreichende Transfektionseffizienz erreicht werden (siehe Abschnitt 5.2.3). Mit viraler Infektion wurde eine Effizienz von 70 % erzielt. Der Nachteil der viralen Infektion ist allerdings, dass die DNA-Sequenzen zunächst in einen viralen Vektor kloniert werden müssen, um dann Viren zu produzieren. Das Verfahren ist zeitintensiv und bedarf spezieller Sicherheitsbedingungen.

Während der Kultivierung der primären Podozyten war aufgefallen, dass bestimmte Klone viel schneller wachsen als andere. Dies kann verschiedene Gründe haben. Die Zellen können entweder stärker proliferieren oder weniger anfällig sein für Faktoren, die zu Apoptose führen. Beide Faktoren bestimmen die Zellviabilität, die wiederum mit dem WST (für "water soluble tetrazolium") Test untersucht werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der TRPC6-defizienten Podozyten signifikant erhöht ist, sowohl im Vergleich zu den WT-Zellen als auch zu den PLC ϵ -Podozyten (siehe Abschnitt 5.2.4).

Da diese erhöhte Viabilität auch an eine verminderte Apoptoserate gekoppelt sein kann, wurde hier auch das Apoptoseverhalten der Podozyten analysiert. Jeder der beschriebenen Tests greift an einem anderen Zeitpunkt des Apoptosezyklus an. Die Caspasen sind zu einem sehr frühen Zeitpunkt aktiv, an dem die Zelle äußerlich noch nicht geschädigt ist. Zu einem späteren Zeitpunkt wird das Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran verlagert, was durch einen Annexin-Test nachgewiesen werden kann. Erst wenn die DNA-Strangbrüche aufweist, können diese dann durch den sog. "TUNEL-Assay" nachgewiesen werden. Mit dem Annexin-basierten Assay konnten in dieser Arbeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Mit dem sog. "TUNEL-Assay" konnte weder in Wildtyp- Podozyten noch in TRPC6-/- Podozyten Apoptose detektiert werden. Der Caspase 3/7-Assay hingegen zeigte eine stark erhöhte Apoptose der WT-Zellen im Vergleich zu den TRPC6-defizienten Podozyten. Wenn im Organismus die Podozyten

in Apoptose gehen, entstehen auf Dauer Löcher in der Blut-Harn-Schranke. Dies zeigt sich dann in einer Proteinurie. Auch in der Literatur wurde erst vor kurzem gezeigt, dass TRPC6-defiziente Mäuse unter der Gabe von Angiotensin II über einen längeren Zeitraum weniger zu Albuminurie neigen als WT-Mäuse [74]. Das Fehlen des offensichtlich proapoptotischen TRPC6-Kanals könnte sich also positiv auf die Blut-Harn-Schranke auswirken. Darüber hinaus konnte kürzlich eine weitere Forschergruppe in den Zelllinien-Podozyten zeigen, dass Calciumionen, die durch die TRPC6-Kanäle in die Zellen gelangen, eine Apoptose auslösen können [111].

Angiotensin II (AngII) ist im Körper ein sehr wichtiger Botenstoff zur Regulation des Blutdrucks. In sog. "Calcium Imaging" Experimenten konnte gezeigt werden, dass Podozyten von Wildtyp-Mäusen auf Zugabe von 100 μ M AngII eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zeigen. In TRPC6- und PLC ϵ -defizienten Zellen ist dieser Einstrom stark vermindert (siehe Abschnitt 5.2.6). Durch den geringeren Calciumioneneinstrom könnte also die calciumabhängige Apoptose oder Nekrose in den Podozyten [111] und die darauf folgende Proteinurie [74] vermindert werden.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass die Blockade des Angiotensin 1(AT₁)-Rezeptors mit Losartan bei Ratten im Endstadium einer Nierenerkrankung den Verlust von Podozyten vermindern kann [112].

Die bisherigen Daten deuten auf eine enge Kooperation zwischen der PLC ϵ und dem TRPC6-Kanal hin. In der Tat ließ sich der TRPC6-Kanal mit einem PLC ϵ -spezifischen Antikörper in primären Podozyten und HEK293-Zellen koimmunpräzipitieren (siehe Abschnitt 5.2.7). Diese Interaktion konnte mit anderen Phospholipase C-Isoformen wie der PLC β 1 nicht gezeigt werden. Darüber hinaus konnte eine inaktivierende („loss-of-function“) PLC ϵ -Mutation (H1144L), die in einem Patienten mit Albuminurie identifiziert wurde, die TRPC6-Kanal-Aktivität inhibieren. In weiteren Experimenten gelang es, die Signaltransduktionskaskade von der Bindung des Angiotensin II an den Angiotensin (AT₁)-Rezeptor über die Aktivierung der PLC ϵ bis zum erhöhten Einstrom von Calciumionen durch den TRPC6-Kanal aufzuklären. Dies gelang mit Hilfe von sog. „Calcium-Imaging“- und „Mangan-Quench“-Experimenten und der Applikation von spezifischen „small hairpin“(sh)-RNAs und des Rho-Toxins (siehe Abschnitt 5.2.9). Phospholipasen dienen als Signalmoleküle in Zellen und werden durch Rho- oder Ras-GTPasen aktiviert [113]. Es gelang, in WT-Podozyten das Angiotensin II-bedingte Calciumsignal mit Rho-Toxinen vollständig zu inhibieren (siehe Abbildung 5.22). Schließlich konnte in einem „Mangan-Quench“-Experiment in HEK293-Zellen mittels einer spezifischen shRNA gegen die G-Protein-Untereinheit G $_{\alpha 12/13}$ gezeigt werden, dass der Ioneneinstrom durch TRPC6-Kanäle vorwiegend durch Aktivierung der G $_{\alpha 12/13}$ -Proteine ausgelöst wird und

nicht durch die $G_{\alpha q}$ -Proteine, die ebenfalls nach Agonistenbindung von AT_1 -Rezeptoren aktiviert werden können. Die resultierende Signaltransduktionskaskade ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Zusätzlich wird eine enge Interaktion des TRPC6-Kanals mit Slo1 BK_{Ca} -Kanälen in Podozyten diskutiert, die die Ca^{2+} -Permeabilität des unselektiven TRPC6-Kationenkanals erhöhen soll ([114] und zusammengefasst in [115]). Welche Auswirkungen hat die TRPC6-Aktivierung nun auf die eigentliche Podozytenfunktion? Die Stabilität des Podozyten und seine Barrierefunktion wird hauptsächlich durch Polymerisation von glomerulärem (G)-Aktin zu dem F-Aktin bestimmt. Eine Aktivierung des RhoA-Proteins bewirkt die Polymerisation und die Ausbildung sogenannter Stressfibern in den Podozyten. Diese Stressfibern sind wichtig für die hohe Barrierefunktion der Podozyten und damit für eine normale Stabilität des Filters (zusammengefasst in [116]). Außerdem führt eine Wechselwirkung von Aktin und Myosin zur Kontraktion der Zelle in Abhängigkeit von Calcium-Ionen.

In Podozyten von Mäusen unterschiedlicher Genotypen wurden die F-Aktin-Fasern mit dem Pilzgift Phalloidin markiert und durch den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Es wurden das Aktinzytoskelett in Podozyten vor und nach Applikation von Angiotensin II (AngII) verglichen (siehe Abbildungen 5.24, 5.25, 5.26, 5.27 und 5.28). Im Grundzustand zeigen die TRPC6-defizienten Podozyten signifikant stärker ausgeprägte F-Aktin-Fasern als WT- oder $PLC\epsilon$ -defiziente Zellen. Aus diesem Grund ist eine verstärkte Ausbildung von Aktin-Stressfibern in diesen Podozyten nach Gabe von Angiotensin II (AngII) im Gegensatz zu den anderen Zellen nicht mehr möglich. In den $PLC\epsilon$ /TRPC6-defizienten Podozyten kann die vermehrte Expression des TRPC1- und TRPC4-Kanals den Ausfall des TRPC6-Kanals offensichtlich nicht kompensieren, während in den $PLC\epsilon$ -defizienten Podozyten, der noch vorhandene TRPC6-Kanal wahrscheinlich über die DAG-Produktion durch $PLC\beta$ aktiviert werden kann (siehe Abbildung 5.28). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen zeigt, dass durch das Ausschalten des TRPC6 durch eine TRPC6-spezifische shRNA in der stabilen induzierbaren Podozytenzelllinie die Bildung der Stressfasern nach Zugabe von Angiotensin II reduziert wird Tian et al. [76]. Auf den ersten Blick scheint dies dem in dieser Arbeit gezeigten Ergebnis zu widersprechen. Jedoch ist diese Zelllinie in diversen Punkten nicht mit primären Podozyten zu vergleichen. So exprimiert diese Zelllinie den TRPC5-Kanal, der in den in dieser Arbeit verwendeten primären Podozyten nicht detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 5.10).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte vor kurzem an Podozyten aus der stabilen Zelllinie, in denen durch die Verwendung von TRPC6-spezifischen siRNAs die TRPC6-Expression inhibiert war, zeigen, dass die Polymerisation des F-Aktins deutlich stärker als in den Wildtyp-Zellen ist [111]. Umgekehrt zeigen Zellen, in denen der TRPC6-Kanal vermehrt

exprimiert wird, nur eine schwache Ausbildung von Aktin-Stressfibern [117].

Bei allen Podozyten, außer den TRPC6-/- Podozyten, konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Zunahme der F-Aktin-Stressfasern festgestellt werden. Am stärksten war sie mit 155 % bei den Wildtyp-Zellen. Durch die Aktivierung des Angiotensin 1(AT₁)-Rezeptors wird das Rho-Protein, das für die Bildung von Aktin-Stressfibern verantwortlich ist, aktiviert (siehe Abbildung 6.1). TRPC6-defiziente Zellen hingegen haben bereits eine vermehrte Aktinstressfaserbildung, so dass nur eine geringe Zunahme möglich ist. Es wurde gezeigt, dass TRPC6-defiziente Mäuse unter dem Einfluss von AngII über einen längeren Zeitraum im Gegensatz zu WT-Mäusen gegen eine Proteinurie geschützt sind [74], was zumindest zum Teil an der stärkeren Ausbildung der Aktin-Stressfibern und einer daraus folgenden erhöhten Barrierefunktion dieser Podozyten liegen könnte. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bestätigen die Hypothese, dass der Calciumioneneinstrom durch den TRPC6-Kanal den Abbau des Rho-Proteins fördert, das wesentlich für die Bildung der Aktin-Stressfibern verantwortlich ist (siehe Abbildung 6.1 und [118, 116]). So kann die Ausbildung von polymerisiertem F-Aktin zur Stressfaserbildung indirekt durch Expression des TRPC6-Kanals inhibiert werden.

Ähnliche Phänomene konnten an konfluenten Podozyten beobachtet werden (siehe Abbildungen 5.29 und 5.30). Die WT-Zellen breiten sich nach der Inkubation mit AngII stärker auf dem Untergrund aus, werden also größer und zeigen mehr Aktin-Stressfibern. TRPC6-defiziente Zellen besitzen bereits vor Applikation von AngII mehr Aktin-Stressfibern. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass ein durch PLC ϵ aktivierter Calciumioneneinstrom durch die Pore des TRPC6-Kanals in der Lage ist, die Aktin-Stressfaserbildung zu inhibieren. Wie bereits gezeigt [118] führt die durch Bindung von Calciumionen induzierte Aktivierung von Calcineurin zur Dephosphorylierung des Synaptopodins. Dies fördert den Abbau des Synaptopodins und verhindert die Inhibition des RhoA-Abbaus durch den Synaptopodin-14-3-3-Komplex. Das Fehlen des TRPC6-Kanals in den TRPC6-defizienten Podozyten führt also zu einer vermehrten Bildung von Aktin-Stressfibern, so dass nach Aktivierung des RhoA über den AT₁-Rezeptor kaum noch zusätzliche Filamente gebildet werden können. In den PLC ϵ -defizienten Zellen hingegen wird durch den Calciumioneneinstrom über kompensatorisch überexprimierte TRPC1/4-Kanalkomplexe der Rho-Abbau ausgelöst. Patienten mit überaktivierten TRPC6-Mutationen zeigen wahrscheinlich einen verstärkten RhoA Abbau und eine verminderte Stressfaserbildung, die die Barrierefunktion des Podozyten herabsetzt und zu einem Funktionsverlust der Schlitzmembran mit zunehmender Albuminurie führt. Darüber hinaus kann der vermehrte Calciumioneneinstrom eine erhöhte Apoptose- oder auch Nekroserate der Podozyten bewirken und ebenfalls die Stabilität des Filters her-

absetzen. Dafür spricht eine gegenüber Wildtyp-Zellen verminderte Apoptoserate und höhere Viabilität von TRPC6-defizienten Podozyten. Ähnliches könnte in Patienten-Podozyten mit funktionsloser PLC ϵ stattfinden, da die höhere Anzahl der TRPC1- und TRPC4-Kanäle ebenfalls zu einem vermehrten Calciumioneneinstrom führt. Allerdings zeigten die PLC ϵ -defizienten Zellen trotz verstärkt exprimierter TRPC1/4 –Kanalkomplexe keine gegenüber den Wildtyp-Podozyten erhöhte Apoptoserate, so dass die PLC ϵ -Mutationen alleine vielleicht nicht ausreichen, um die typischen Merkmale einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) hervorzurufen. Dafür spricht auch, dass in neueren Veröffentlichungen über PLC ϵ -Patientenmutationen keine klare Genotyp-Phänotyp Zuordnung möglich war und dass drei Individuen und ein Vater der Patienten mit homozygoter „loss-of-function“ PLC ϵ -Mutation keine Symptome zeigten [119, 120, 103]. Darüber hinaus kann das durch Calciumionen aktivierte Calcineurin zusätzlich auch den Transkriptionsfaktor „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT) dephosphorylieren. Die dephosphorylierte und somit aktive Form von NFAT kann in den Kern der Zelle wandern und dort die Transkription wichtiger Zielgene initiieren. Zwei (R895C und E897K) der TRPC6-Mutationen, die in der Podozytenzelllinie überexprimiert wurden, erhöhten die intrazelluläre Calciumionenkonzentration signifikant und führten zu einer vermehrten NFAT-Aktivierung [121]. In einer weiteren Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass eine NFAT-Aktivierung in Mäusen eine Proteinurie und eine Glomerulosklerose auslösen kann. Die Expression von Synaptopodin wurde durch die NFAT-Aktivierung vermindert, während Proteine der sog. Wnt-Signalkaskade vermehrt transkribiert wurden [122]. Auch die Expression des TRPC6-Kanals kann über diesen Weg durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus weiter erhöht werden [73]. Ob eine NFAT-Inhibition durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A jedoch, wie von den Autoren postuliert, allein ausreicht, um eine Proteinurie auch in den Patienten zu verhindern, bleibt fraglich [123]. Alle diese Aspekte sollen in Zukunft durch Expression der TRPC6- und PLC ϵ -Mutationen der FSGS-Patienten in primären Podozyten noch näher untersucht werden. Darüber hinaus wird auch die Quantifizierung der Aktivierung von TRPC6 durch PLC β und PLC ϵ in vielen primären Zellen und Zelllinien weiterhin Gegenstand der Forschung in der Arbeitsgruppe bleiben.

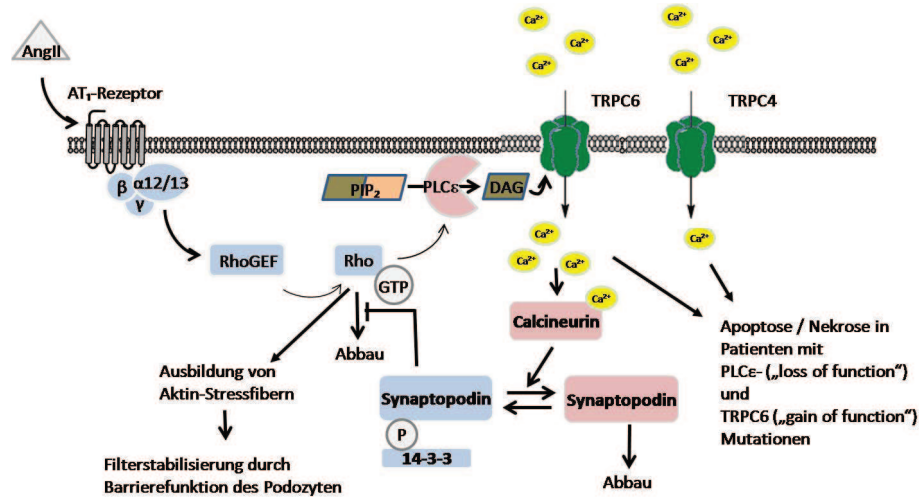


Abbildung 6.1: Zusammenfassung der Befunde dieser Doktorarbeit im Gesamtkonzept der wissenschaftlichen Literatur zu dem Thema. Proteine der Podozyten, die durch Aktivierung die Barrierefunktion der Podozyten erhöhen und damit die Schlitzmembran stabilisieren, sind blau hervorgehoben. Proteine, die diese Vorgänge hemmen und Symptome der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) bei den Patienten auslösen können, sind rot oder grün (TRPC-Kanäle) markiert. Eine Aktivierung des Angiotensin 1-Rezeptors (AT₁-Rezeptor) durch Angiotensin II (AngII) z. B. bei Bluthochdruck führt über die G-Protein α12/13-Untereinheiten zur Aktivierung des Rho Guaninnukleotidaustauschfaktors (RhoGEF) zu aktivierten GTP-beladenen Rho-Proteinen, die für die Bildung von Aktin-Stressfasern verantwortlich sind. Rho-Proteine können auch die PLCε aktivieren, die durch Bildung von Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) einen Calciumionen-einstrom durch den TRPC6-Kanal auslösen kann. Die erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration führt zur Aktivierung von Calcineurin, das Synaptopodin dephosphoryliert und für einen proteolytischen Abbau zugänglich macht. Phosphoryliertes Synaptopodin hingegen ist in der Lage, den Abbau von Rho-Proteinen zu unterbinden ([118] und zusammengefasst in [116]). Vermehrter Calciumioneneinstrom durch überaktiviert („gain-of-function“) mutierte TRPC6-Kanäle kann also durch vermehrten Rho-Abbau die Aktin-Stressfaser-Bildung inhibieren. Zusätzlich kann der Calciumioneneinstrom über mutierte TRPC6- und vermehrt exprimierte TRPC1/4-Kanäle in PLCε-defizienten Podozyten eine Apoptose oder Nekrose der Podozyten auslösen und durch eine verminderte Stabilität der Schlitzmembran eine Albuminurie in FSGS-Patienten induzieren.

6.3 Ausblick

In den vorliegenden Experimenten konnte initial gezeigt werden, dass die Proteine TRPC6 und PLC ϵ eine entscheidende Rolle für die Funktion, aber auch für die pathologischen Veränderungen der primären murinen Podozyten haben. Weitere Untersuchungen zur Rolle der Patientenmutationen in primären Podozyten müssen nun folgen, um die postulierten Hypothesen zu bestätigen oder zu verwerfen. In dieser Arbeit hat sich die Transfektion mit rekombinanten Lentiviren als effizientes System erwiesen.

Bisher gibt es keine effiziente kausale Therapie für Patienten, die an fokaler segmentaler Glomerulosklerose leiden. Erste Wahl sind Glucocorticoide und bei Steroidresistenz werden Cyclosporin A und andere Immunsuppressiva verordnet, die alle sehr starke Nebenwirkungen beim Patienten hervorrufen können. Ein spezifischer TRPC6-Kanalblocker wäre für die Patienten mit einer überaktivierten TRPC6-Mutation sicherlich hilfreich. Ähnlich wichtig wäre dieser Blocker zur Inhibition eines Ischämie-Reperfusionsschaden in Lungen, die zur Transplantation bestimmt sind, wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte [124]. Natürlich sollten vorher eventuelle Nebenwirkungen durch Blockade von TRPC6-Kanälen in anderen Geweben im Tierversuch identifiziert und evaluiert werden.

In den Podozyten werden auch der TRPC1- und TRPC4-Kanal exprimiert und eine vermehrte Expression in PLC ϵ -defizienten Zellen konnte ebenfalls in dieser Arbeit identifiziert werden.

Daher wäre es sehr wichtig, Podozyten der entsprechenden Mausmodelle zu untersuchen. TRPC4 $^{-/-}$ Mäuse sind bereits von einer anderen Gruppe beschrieben worden [47] und TRPC1-defiziente Mäuse wurden schon in dieser Arbeit verwendet. Es wäre zu erwarten, dass Podozyten aus Mäusen, denen der TRPC1- und der TRPC4-Kanal fehlen, sich ähnlich verhalten wie die TRPC6-defizienten Zellen.

Für den mTRPC1 konnte hier gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle bei der Migration und Proliferation von murinen embryonalen Fibroblasten spielt. In Zukunft wird es durch die Entwicklung von effizienten und spezifischen TRPC1-Antikörpern möglich sein, seine Translokation zur Zellmembran und die Heteromerisierung mit anderen TRPC-Monomeren in nativen Geweben und primären Zellen zu verfolgen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
µL	Microliter
A	Agonist
AngII	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosinetriphosphat
BDNF	brain-derived neurotropic factor
BSA	bovines serum albumin
CaMK	Calmodulin abhängige Kinase
cDNA	copy DNA
CIF	calcium influx factor
CIRB	Calmodulin/IP ₃ Rezeptor Bindungsstelle
cm	Zentimeter
CNG	cyclic nucleotide gated
CT	Schwellenwert Zyklus
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

7 Anhang

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
EST	expressed sequence tags
FCS	fötales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-acetoxymethylester
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
HBS	hepes buffered saline
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293	human embryonal kidney, humane, embryonale Nierenzellen
I_{CRAC}	calcium release activated channel
I-mfa	Inhibitor of myogenic family
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IVC	isolated ventilated cages, spezielle Mauskäfige
kD	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampère

7 Anhang

mASMC	glatte Muskelzellen aus der Aorta der Maus
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mN	Millinewton
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
mTSMC	glatte Muskelzellen aus der Trachea der Maus
NFAT	Nukleärer Faktor der aktivierten T-Zellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PAR-2	Protease-aktivierter Rezeptor 2
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS mit Tween
PCR	polymerase chain reaction
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLC ϵ ^{-/-}	genedefizient für PLC ϵ ^{-/-}
pmol	Picomol
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	receptor operated channel

7 Anhang

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	reverse transkriptase PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat
SERCA	smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase
siRNA	small interference RNA
SOC	store operated channel
STIM	Stromal interaction molecule
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimidester
SV40	Simianes Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomänen
TRP	transient receptor potential
TRPC	transient receptor potential classical
TRPC1(-/-)	gendefizient für TRPC1
TRPC6(-/-)	gendefizient für TRPC6
UV	ultraviolett
VNO	Vomeronasalorgan
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Danksagung

Ohne die Unterstützung von einigen Personen wäre diese Arbeit nie entstanden und daher möchte ich mich hiermit bei denen bedanken, die mir vor und während meiner Doktorarbeit in unterschiedlicher Weise geholfen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Gudermann, für die Möglichkeit in seinem Institut meine Doktorarbeit durchführen zu können.

Auch bedanke ich mich bei den verschiedenen Gutachtern meiner Arbeit für ihre Mühe. Leider kann ich diese hier noch nicht namentlich auflühren, da mir diese noch nicht bekannt sind.

Ich bedanke mich bei meinem großartigen Betreuer Herrn Professor Dr. Alexander Dietrich, der mich während der ganzen Zeit unterstützt hat, mit Anregungen, Worten und Taten. DANKE!

Ich bedanke mich bei meinen lieben Kollegen der Arbeitsgruppen Gudermann, Czubyko und Plant aus Marburg, die mir in den ersten zwei Jahren meiner Arbeit eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Hermann Kalwa bedanken. Hermann Du bist der Beste!!

Ich möchte mich selbstverständlich auch bei meinen Münchner Kollegen des Walther-Straub-Institutes bedanken, die mich im letzten Jahr meiner Doktorarbeit immer unterstützt haben.

Vielen Dank auch meinen lieben Korrekturleserinnen Brigitte, Eva, Anna und Steffi.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern Dorothee und Hanns Fahlbusch, die immer alles getan haben, um mir die besten Voraussetzungen für all das zu schaffen und jeder Zeit unterstützend zur Seite standen.

Allen hier Erwähnten und auch denen, die ich hier vergessen habe, nochmal vielen Dank für die Unterstützung im Labor, für die vielen Ideen und Tipps, für die schönen Kaffeepausen und alles was Ihr in den letzten drei Jahren für mich getan habt. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

Literaturverzeichnis

- [1] Reiser, J. et al. (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 37, 739–744.
- [2] Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M., and Rosenberg, P. B. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308, 1801–1804.
- [3] Hinkes, B. et al. (2006) Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38, 1397–1405.
- [4] Bunney, T. D., and Katan, M. (2006) Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol* 16, 640–648.
- [5] Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., and Lai, F. A. (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533–3544.
- [6] Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., and Clapham, D. E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321–326.
- [7] Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17, 414–422.
- [8] Banno, Y., Okano, Y., and Nozawa, Y. (1994) Thrombin-mediated phosphoinositide hydrolysis in Chinese hamster ovary cells overexpressing phospholipase C-delta 1. *J Biol Chem* 269, 15846–15852.
- [9] Shibatohe, M., Kariya, K., Liao, Y., Hu, C. D., Watari, Y., Goshima, M., Shima, F., and Kataoka, T. (1998) Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *J Biol Chem* 273, 6218–6222.

- [10] Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E., and Lomasney, J. W. (2001) A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 2758–2765.
- [11] Wing, M. R., Houston, D., Kelley, G. G., Der, C. J., Siderovski, D. P., and Harden, T. K. (2001) Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits. *J Biol Chem* 276, 48257–48261.
- [12] Wing, M. R., Snyder, J. T., Sondek, J., and Harden, T. K. (2003) Direct activation of phospholipase C-epsilon by Rho. *J Biol Chem* 278, 41253–41258.
- [13] Jin, T. G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C. D., and Kataoka, T. (2001) Role of the CDC25 homology domain of phospholipase Cepsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J Biol Chem* 276, 30301–30307.
- [14] Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P. A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J. W., and Jakobs, K. H. (2001) A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* 3, 1020–1024.
- [15] Cosens, D. J., and Manning, A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285–287.
- [16] Minke, B., Wu, C., and Pak, W. L. (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84–87.
- [17] Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387–417.
- [18] Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I., and Shyjan, A. W. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58, 1515–1520.
- [19] Montell, C. et al. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9, 229–231.
- [20] Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
- [21] Cheng, W., Sun, C., and Zheng, J. (2010) Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 1, 802–810.
- [22] Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schäfer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jüngling, E., Rocks, O., Lückhoff, A., and Frey, J. (2002) Structural domains required

- p>for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta.
- FEBS Lett*
- 523, 193–199.
- [23] Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7461–7466.
 - [24] Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278, 39014–39019.
 - [25] Birnbaumer, L. (2009) The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 395–426.
 - [26] Cahalan, M. D. (2009) STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* 11, 669–677.
 - [27] Liao, Y., Plummer, N. W., George, M. D., Abramowitz, J., Zhu, M. X., and Birnbaumer, L. (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca2+ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca2+ entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3202–3206.
 - [28] Hong, J. H., Li, Q., Kim, M. S., Shin, D. M., Feske, S., Birnbaumer, L., Cheng, K. T., Ambudkar, I. S., and Muallem, S. (2011) Polarized but differential localization and recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC channels in secretory cells. *Traffic* 12, 232–245.
 - [29] Albert, A. P. (2011) Gating mechanisms of canonical transient receptor potential channel proteins: role of phosphoinositols and diacylglycerol. *Adv Exp Med Biol* 704, 391–411.
 - [30] Wang, W., O’Connell, B., Dykeman, R., Sakai, T., Delporte, C., Swaim, W., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Ambudkar, I. S. (1999) Cloning of Trp1beta isoform from rat brain: immunodetection and localization of the endogenous Trp1 protein. *Am J Physiol* 276, C969–C979.
 - [31] Nilius, B., and Owsianik, G. (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12, 218.

- [32] Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A. G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1996) Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16, 1189–1196.
- [33] Gudermann, T., Hofmann, T., y Schnitzler, M. M., and Dietrich, A. (2004) Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp* 258, 103–18; discussion 118–22, 155–9, 263–6.
- [34] Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645–655.
- [35] Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Ramachandran, J., and Capon, D. J. (1988) Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334, 434–437.
- [36] Liman, E. R., Corey, D. P., and Dulac, C. (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5791–5796.
- [37] Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2000) Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J* 351, 115–122.
- [38] Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551–561.
- [39] Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493–1500.
- [40] Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., and Pangalos, M. N. (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 109, 95–104.
- [41] Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263.

- [42] Li, H. S., Xu, X. Z., and Montell, C. (1999) Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24, 261–273.
- [43] Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., and Konnerth, A. (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59, 392–398.
- [44] Vannier, B., Zhu, X., Brown, D., and Birnbaumer, L. (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273, 8675–8679.
- [45] Dietrich, A., y Schnitzler, M. M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., and Guder-
mann, T. (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem* 278, 47842–47852.
- [46] McKay, R. R., Szymeczek-Seay, C. L., Lievremon, J. P., Bird, G. S., Zitt, C., Jüngling, E., Lückhoff, A., and Putney, J. W. (2000) Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. *Biochem J* 351 Pt 3, 735–746.
- [47] Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat Cell Biol* 3, 121–127.
- [48] Munsch, T., Freichel, M., Flockerzi, V., and Pape, H.-C. (2003) Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16065–16070.
- [49] von Spiczak, S., Muhle, H., Helbig, I., de Kovel, C. G. F., Hampe, J., Gaus, V., Koeleman, B. P. C., Lindhout, D., Schreiber, S., Sander, T., and Stephani, U. (2010) Association study of TRPC4 as a candidate gene for generalized epilepsy with photosensitivity. *Neuromolecular Med* 12, 292–299.
- [50] Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., and Mori, Y. (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273, 10279–10287.

- [51] Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalié, A., and Flockerzi, V. (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17, 4274–4282.
- [52] Naylor, J., Al-Shawaf, E., McKeown, L., Manna, P. T., Porter, K. E., O'Regan, D., Muraki, K., and Beech, D. J. (2011) TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes. *J Biol Chem* 286, 5078–5086.
- [53] Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272, 29672–29680.
- [54] Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med (Berl)* 78, 14–25.
- [55] Ding, X., He, Z., Shi, Y., Wang, Q., and Wang, Y. (2010) Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert Opin Ther Targets* 14, 513–527.
- [56] Weissmann, N., Zeller, S., Schäfer, R. U., Turowski, C., Ay, M., Quanz, K., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Fink, L., Seeger, W., and Grimminger, F. (2006) Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 505–513.
- [57] Fuchs, B., Rupp, M., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Seeger, W., Grimminger, F., Gudermann, T., Dietrich, A., and Weissmann, N. (2011) Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir Res* 12, 20.
- [58] Dietrich, A., Chubanov, V., and Gudermann, T. (2010) Renal TRP channels. *J Am Soc Nephrol* 21, 736–744.
- [59] Beck, B., Zholos, A., Sydorenko, V., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2006) TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 126, 1982–1993.
- [60] Lièvreumont, J.-P., Bird, G. S. J., and Putney, J. W. (2004) Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1709–C1716.

- [61] Lievremont, J.-P., Numaga, T., Vazquez, G., Lemonnier, L., Hara, Y., Mori, E., Trebak, M., Moss, S. E., Bird, G. S., Mori, Y., and Putney, J. W. (2005) The role of canonical transient receptor potential 7 in B-cell receptor-activated channels. *J Biol Chem* 280, 35346–35351.
- [62] Farquhar, M. G. (1975) Editorial: The primary glomerular filtration barrier—basement membrane or epithelial slits? *Kidney Int* 8, 197–211.
- [63] D’Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A., and Jennette, J. C. (2004) Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 43, 368–382.
- [64] Goldszer, R. C., Sweet, J., and Cotran, R. S. (1984) Focal segmental glomerulosclerosis. *Annu Rev Med* 35, 429–449.
- [65] Heeringa, S. F., Möller, C. C., Du, J., Yue, L., Hinkes, B., Chernin, G., Vlanagos, C. N., Hoyer, P. F., Reiser, J., and Hildebrandt, F. (2009) A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One* 4, e7771.
- [66] Möller, C. C., Flesche, J., and Reiser, J. (2009) Sensitizing the Slit Diaphragm with TRPC6 ion channels. *J Am Soc Nephrol* 20, 950–953.
- [67] Zhu, B., Chen, N., Wang, Z.-H., Pan, X.-X., Ren, H., Zhang, W., and Wang, W.-M. (2009) Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutat Res* 664, 84–90.
- [68] Santín, S. et al. (2009) TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 24, 3089–3096.
- [69] Gigante, M., Caridi, G., Montemurno, E., Soccio, M., d’Apolito, M., Cerullo, G., Aucella, F., Schirinzi, A., Emma, F., Massella, L., Messina, G., Palo, T. D., Raineri, E., Ghiggeri, G. M., and Gesualdo, L. (2011) TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 1626–1634.
- [70] Mir, S., Yavascan, O., Berdeli, A., and Sozeri, B. (2011) TRPC6 gene variants in Turkish children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*.

- [71] Löwik, M. M., Groenen, P. J., Levchenko, E. N., Monnens, L. A., and van den Heuvel, L. P. (2009) Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *Eur J Pediatr* 168, 1291–1304.
- [72] Mundel, P., Reiser, J., Borja, A. Z. M., Pavenstädt, H., Davidson, G. R., Kriz, W., and Zeller, R. (1997) Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236, 248–258.
- [73] Nijenhuis, T. et al. (2011) Angiotensin II Contributes to Podocyte Injury by Increasing TRPC6 Expression via an NFAT-Mediated Positive Feedback Signaling Pathway. *Am J Pathol*.
- [74] Eckel, J. et al. (2011) TRPC6 enhances angiotensin II-induced albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 22, 526–535.
- [75] Yu, L., Lin, Q., Liao, H., Feng, J., Dong, X., and Ye, J. (2010) TGF- β 1 induces podocyte injury through Smad3-ERK-NF- κ B pathway and Fyn-dependent TRPC6 phosphorylation. *Cell Physiol Biochem* 26, 869–878.
- [76] Tian, D., Jacobo, S. M. P., Billing, D., Rozkalne, A., Gage, S. D., Anagnostou, T., Pavenstädt, H., Pavenstaedt, H., Hsu, H.-H., Schlondorff, J., Ramos, A., and Greka, A. (2010) Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal* 3, ra77.
- [77] Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., y Schnitzler, M. M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaya, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455, 465–477.
- [78] Ray, F. A., and Nickoloff, J. A. (1992) Site-specific mutagenesis of almost any plasmid using a PCR-based version of unique site elimination. *Biotechniques* 13, 342–348.
- [79] Dietrich, A., Schnitzler, M. M. Y., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaya, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F. C., Gudermann, T., and Birnbaumer, L. (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice. *Mol Cell Biol* 25, 6980–6989.
- [80] Wang, H., Oestreich, E. A., Maekawa, N., Bullard, T. A., Vikstrom, K. L., Dirksen, R. T., Kelley, G. G., Blaxall, B. C., and Smrcka, A. V. (2005) Phospholipase

- C epsilon modulates beta-adrenergic receptor-dependent cardiac contraction and inhibits cardiac hypertrophy. *Circ Res* 97, 1305–1313.
- [81] Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.
- [82] Rastaldi, M. P. et al. (2006) Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J* 20, 976–978.
- [83] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- [84] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- [85] Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413–417.
- [86] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
- [87] Sharp, P. A., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055–3063.
- [88] www.biophysics.com.
- [89] Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440–3450.
- [90] www.promega.com.
- [91] www.roche-applied-science.com.
- [92] Barth, H., Hofmann, F., Olenik, C., Just, I., and Aktories, K. (1998) The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun* 66, 1364–1369.

- [93] Barth, H., Blocker, D., Behlke, J., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Benz, R., and Aktories, K. (2000) Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem* 275, 18704–18711.
- [94] Grzelinski, M., Pinkenburg, O., Büch, T., Gold, M., Stohr, S., Kalwa, H., Guder-
mann, T., and Aigner, A. (2010) Critical role of G(alpha)12 and G(alpha)13 for
human small cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo.
Clin Cancer Res 16, 1402–1415.
- [95] Schnabel, P., and Camps, M. (1998) Activation of a phospholipase Cbeta2 deletion
mutant by limited proteolysis. *Biochem J* 330 (Pt 1), 461–468.
- [96] Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M.,
and Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing
cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- [97] Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., and Muallem, S. (2007) STIM1
heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated
channels. *Nat Cell Biol* 9, 636–645.
- [98] Sakura, H., and Ashcroft, F. M. (1997) Identification of four trp1 gene variants
murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 40, 528–532.
- [99] Ma, R., Rundle, D., Jacks, J., Koch, M., Downs, T., and Tsiokas, L. (2003) Inhi-
bitor of myogenic family, a novel suppressor of store-operated currents through an
interaction with TRPC1. *J Biol Chem* 278, 52763–52772.
- [100] Fahlbusch, M. *Analyse der Funktion des TRPC1-Proteins durch Charakterisierung
eines TRPC1-defizienten Mausmodells*; 2008.
- [101] Fabian, A., Fortmann, T., Dieterich, P., Riethmüller, C., Schön, P., Mally, S., Nili-
us, B., and Schwab, A. (2008) TRPC1 channels regulate directionality of migrating
cells. *Pflugers Arch* 457, 475–484.
- [102] Sweeney, M., Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, S., McDaniel, S. S., and Yuan, J. X.-
J. (2002) Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and
attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung
Cell Mol Physiol* 283, L144–L155.
- [103] Boyer, O. et al. (2010) Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant
nephrotic syndrome. *J Med Genet* 47, 445–452.

- [104] Smeets, B., Uhlig, S., Fuss, A., Mooren, F., Wetzels, J. F. M., Floege, J., and Moeller, M. J. (2009) Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 20, 2604–2615.
- [105] Mundel, P., Heid, H. W., Mundel, T. M., Krüger, M., Reiser, J., and Kriz, W. (1997) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139, 193–204.
- [106] Kim, E. Y., Alvarez-Baron, C. P., and Dryer, S. E. (2009) Canonical transient receptor potential channel (TRPC)3 and TRPC6 associate with large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BKCa) channels: role in BKCa trafficking to the surface of cultured podocytes. *Mol Pharmacol* 75, 466–477.
- [107] Greka, A., and Mundel, P. (2011) Balancing Calcium Signals through TRPC5 and TRPC6 in Podocytes. *J Am Soc Nephrol*.
- [108] Piper, C. *Dissertation an der Philipps-Universität Marburg: Die Expression und Funktion des TRPC6-Kanals*; 2009.
- [109] Lu, T. C., Wang, Z., Feng, X., Chuang, P., Fang, W., Chen, Y., Neves, S., Maayan, A., Xiong, H., Liu, Y., Iyengar, R., Klotman, P. E., and He, J. C. (2008) Retinoic acid utilizes CREB and USF1 in a transcriptional feed-forward loop in order to stimulate MKP1 expression in human immunodeficiency virus-infected podocytes. *Mol Cell Biol* 28, 5785–5794.
- [110] Lu, T.-C., He, J. C., Wang, Z.-H., Feng, X., Fukumi-Tominaga, T., Chen, N., Xu, J., Iyengar, R., and Klotman, P. E. (2008) HIV-1 Nef disrupts the podocyte actin cytoskeleton by interacting with diaphanous interacting protein. *J Biol Chem* 283, 8173–8182.
- [111] Chen, S., He, F.-F., Wang, H., Fang, Z., Shao, N., Tian, X.-J., Liu, J.-S., Zhu, Z.-H., Wang, Y.-M., Wang, S., Huang, K., and Zhang, C. (2011) Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium*.
- [112] Fukuda, A., Wickman, L. T., Venkatarreddy, M. P., Sato, Y., Chowdhury, M. A., Wang, S. Q., Shedden, K. A., Dysko, R. C., Wiggins, J. E., and Wiggins, R. C. (2012) Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney International* 81, 40–55.

- [113] Bunney, T. D., and Katan, M. (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci* 36, 88–96.
- [114] Kim, E. Y., and Dryer, S. E. (2011) Effects of insulin and high glucose on mobilization of slo1 BKCa channels in podocytes. *J Cell Physiol* 226, 2307–2315.
- [115] Dryer, S. E., and Reiser, J. (2010) TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F689–F701.
- [116] Mundel, P., and Reiser, J. (2010) Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int* 77, 571–580.
- [117] Jiang, L., Ding, J., Tsai, H., Li, L., Feng, Q., Miao, J., and Fan, Q. (2011) Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca^{2+} and RhoA activation. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 184–193.
- [118] Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y. H., Franz, S., Delfgaauw, J., Chang, J.-M., Choi, H. Y., Campbell, K. N., Kim, K., Reiser, J., and Mundel, P. (2008) The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 14, 931–938.
- [119] Gbadegesin, R., Bartkowiak, B., Lavin, P. J., Mukerji, N., Wu, G., Bowling, B., Eckel, J., Damodaran, T., and Winn, M. P. (2009) Exclusion of homozygous PLCE1 (NPHS3) mutations in 69 families with idiopathic and hereditary FSGS. *Pediatr Nephrol* 24, 281–285.
- [120] Gilbert, R. D., Turner, C. L. S., Gibson, J., Bass, P. S., Haq, M. R., Cross, E., Bunyan, D. J., Collins, A. R., Tapper, W. J., Needell, J. C., Dell, B., Morton, N. E., Temple, I. K., and Robinson, D. O. (2009) Mutations in phospholipase C epsilon 1 are not sufficient to cause diffuse mesangial sclerosis. *Kidney Int* 75, 415–419.
- [121] Schlöndorff, J., Camino, D. D., Carrasquillo, R., Lacey, V., and Pollak, M. R. (2009) TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C558–C569.
- [122] Wang, Y., Jarad, G., Tripathi, P., Pan, M., Cunningham, J., Martin, D. R., Liapis, H., Miner, J. H., and Chen, F. (2010) Activation of NFAT signaling in podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1657–1666.

Literaturverzeichnis

- [123] Bensman, A., and Niaudet, P. (2010) Non-immunologic mechanisms of calcineurin inhibitors explain its antiproteinuric effects in genetic glomerulopathies. *Pediatr Nephrol* 25, 1197–1199.
- [124] Weissmann, N. et al. (2012 in press) Activation of TRPC6 channels is essential for ischaemia - reperfusion-induced lung edema in mice. *Nature Communications*.